

In vivo Chemotaxis im Sulcus gingivae bei Patienten mit Diabetes mellitus und Parodontitis

Sarah Kristin Sonnenschein

INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Zahnmedizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen

Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**In vivo Chemotaxis im Sulcus gingivae bei
Patienten mit Diabetes mellitus und Parodontitis**

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Sarah Kristin Sonnenschein

aus Haan/Rheinland

Gießen 2013

Aus dem
Medizinischen Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde,
Poliklinik für Parodontologie
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen
Direktor: Prof. Dr. J. Meyle

Gutachter: Prof. Dr. J. Meyle

Gutachter: PD Dr. N. Ewald

Tag der Disputation: 07.11.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	iii
1. Einleitung	1
2. Wissenschaftliche Grundlagen	2
2.1 Definition, Diagnose und Klassifikation von Diabetes mellitus.....	2
2.2 Parodontopathien und ihre Verlaufsformen.....	6
2.3 Sulcusflüssigkeits-Fließrate (SFFR).....	8
2.4 Diabetes mellitus als Risikofaktor für Parodontitis.....	11
2.5 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten	16
2.5.1 CD11b/CD18-Komplex (MAC-1, CR3).....	20
2.5.2 CD15 (Sialyl LewisX)	20
2.6 Chemotaxisuntersuchungen	21
3. Ziele der Studie	26
4. Materialien und Methoden	27
4.1 Studiendesign.....	27
4.2 Votum der Ethikkommission	27
4.3 Selektion der Studienpopulation	27
4.4 Aufklärung der Studienteilnehmer	28
4.5 Methodik und Vorversuche	29
4.5.1 Methode nach MEYLE	29
4.5.2 PMN-Einwanderungskinetik.....	31
4.6 Klinische Eingangsuntersuchung	33
4.7 Mundhygienephase	34
4.8 Blutentnahme	37
4.9 Quantifizierung der PMN-Oberflächenantigene.....	37
4.10 Durchflusszytometrie	39
4.11 Sulcusflüssigkeits-Volumenbestimmung mit dem Periotron 8000®	40
4.12 PMN-Isolation aus dem peripheren Blut.....	41
4.13 Herstellung des Chemotaktikums	42

4.14	Registrierung und Dokumentation.....	43
4.15	Statistische Datenauswertung.....	43
5.	Ergebnisse	45
5.1	Ergebnisse der Vorversuche.....	45
5.1.1	Etablierung der Methodik.....	45
5.1.2	PMN _{SF} -Einwanderungskinetik.....	48
5.2	Demographische Daten	50
5.3	Klinische Beschreibung der Gruppen.....	51
5.3.1	Zahnanzahl.....	51
5.3.2	Sondierungstiefe des Gesamtgebisses (ST _{ges})	51
5.3.3	Attachmentniveau des Gesamtgebisses (CAL).....	52
5.3.4	Blutung auf Sondierung (BOP)	52
5.4	Sondierungstiefen an Test- und Kontrollzähnen	52
5.5	Mundhygienephase	54
5.5.1	Papillenblutungsindex (PBI).....	54
5.5.2	Plaqueindex (PLI)	57
5.5.3	Sulcusflüssigkeits (SF)-Volumen	59
5.5.4	Klinisches Erscheinungsbild und Orthopantomogramme	61
5.6	Hämatologie und Diagnostik	64
5.6.1	Plasma-Glukose-Werte.....	64
5.6.2	HbA1c-Werte	65
5.6.3	Body-Mass-Index (BMI)	66
5.6.4	C-reaktives Protein (CRP)	67
5.6.5	Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG)	68
5.6.6	Anzahl neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut	69
5.7	PMN-Einwanderung und Rezeptorexpression	70
5.7.1	Anzahl eingewanderter CD45+ Zellen	70
5.7.2	Oberflächenexpression CD11b.....	75
5.7.3	Oberflächenexpression CD15.....	80

6.	Diskussion.....	85
6.1	Methodendiskussion	85
6.1.1	Mundhygienephase	85
6.1.2	Chemotaxistests	85
6.1.3	Sulcusflüssigkeits-Fließrate	86
6.1.4	Durchflusszytometrie	87
6.2	Ergebnisdiskussion.....	87
6.2.1	Blutglukose und HbA1c	87
6.2.2	Hämatologie	88
6.2.3	Body-Mass-Index.....	89
6.2.4	Schweregrad der parodontalen Erkrankung.....	89
6.2.5	Mundhygieneindizes	90
6.2.6	Sulcusflüssigkeits-Fließrate (SFFR).....	91
6.2.7	PMN-Einwanderung.....	93
6.2.8	PMN-Oberflächenexpression CD11b und CD15.....	99
7.	Zusammenfassung.....	102
8.	Summary.....	103
9.	Abkürzungsverzeichnis	104
10.	Abbildungsverzeichnis.....	107
11.	Tabellenverzeichnis.....	110
12.	Literaturverzeichnis	112
13.	Anhang.....	128
14.	Ehrenwörtliche Erklärung	140
15.	Danksagung.....	141

1. Einleitung

Bei Diabetes mellitus (DM) handelt es sich um eine durch chronische Hyperglykämie charakterisierte heterogene Gruppe metabolischer Störungen an der in Deutschland bis zu 12 % der Bevölkerung erkrankt sind (IDF, 2009). Mit 90-95 % stellt DM Typ 2 die häufigste Form dieser Erkrankung dar, der meist eine erworbene Insulinresistenz in Kombination mit einer Störung der Insulinsekretion zugrunde liegt (ADA, 2010).

Parodontitis ist eine primär durch einen bakteriellen Biofilm verursachte Entzündung des gesamten Zahnhalteapparates, die durch verschiedene Faktoren, wie beispielsweise systemischen Erkrankungen und Veränderungen des Immunsystems, beeinflusst werden kann. In Deutschland sind 53 % der 35-44 Jährigen von einer mittelschweren Form der Parodontitis betroffen (Holtfreter, Kocher, Hoffmann, Desvarieux, & Micheelis, 2010).

Der Zusammenhang zwischen diesen beiden multifaktoriellen Erkrankungen wurde in zahlreichen Querschnitts- und Longitudinalstudien nachgewiesen und eine bidirektionale Beeinflussung wird angenommen (Lalla & Papapanou, 2011). Zahlreiche Studien weisen bei Diabetikern auf einen proinflammatorischen Zustand des Immunsystems hin, der durch erhöhte Zytokinspiegel charakterisiert ist (Donath & Shoelson, 2011; Salvi, Yalda, et al., 1997). Die primären Zellen des angeborenen Immunsystems sind polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN). PMN verlassen *via* Diapedese den peripheren Blutstrom, um durch Chemotaxis an den Ort der Entzündung zu gelangen und sind die im gingivalen Sulcus vorherrschenden Immunzellen (Cimasoni, 1983). *In vitro* konnte bei PMN, die aus peripherem Blut von Diabetikern isoliert wurden, eine verminderte Chemotaxis festgestellt werden (Delamaire et al., 1997; Shetty, Thomas, & Ramesh, 2008). Diese Feststellung scheint im Gegensatz zu den bei Diabetikern in klinischen Studien beobachteten verstärkten gingivalen Entzündungsreaktionen zu stehen (Hugoson, Thorstensson, Falk, & Kuylenstierna, 1989; Salvi, Kandyaki, Troendle, Persson, & Lang, 2005).

In dieser Arbeit wurde die lokale Chemotaxis der PMN im *Sulcus gingivae* bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis, bei systemisch gesunden Parodontitispatienten und bei Gesunden *in vivo* getestet. Die Testung der Chemotaxis erfolgte über die Applikation eines standardisierten inflammatorischen Reizes in den Sulcus und die anschließende Auszählung eingewanderter PMN sowie über die Bestimmung der Oberflächenexpression der an der Diapedese beteiligten Oberflächenrezeptoren CD11b und CD15.

2. Wissenschaftliche Grundlagen

2.1 Definition, Diagnose und Klassifikation von Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) stellt eine durch chronische Hyperglykämie charakterisierte Regulationsstörung des Stoffwechsels dar, der ein Defekt der Insulinsekretion, der Insulinwirkung oder beides zugrunde liegt (ADA, 2008, 2010). Insulin ist das einzige blutzuckersenkende Hormon und wird in den β -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas produziert. Mit seinen Antagonisten Glukagon, Kortisol, Katecholaminen und Wachstumshormonen ist es für die Einstellung einer konstanten Blutglukosekonzentration zuständig. Die wesentliche Aufgabe des Insulins liegt in der Vermittlung der Glukoseaufnahme aus dem Blut und der Gewebsflüssigkeit in das Zellinnere. In den Zielgeweben bewirkt Insulin die Translokation von insulinabhängigen Glukosetransportern in die Zellmembran, wodurch die Zellen Glukose aufnehmen können und der Blutzuckerspiegel gesenkt wird. Glukose ist als Energielieferant für die Zellen des menschlichen Körpers, besonders des zentralen Nervensystems und der inneren Organe, von zentraler Bedeutung. Die Ausschüttung von Insulin wird durch den Blutglukosespiegel reguliert. Steigt der Blutglukosespiegel nach der Nahrungsaufnahme an, nehmen die β -Zellen über insulinunabhängige Glukosetransporter die Glukose aus dem Blut auf. Dies induziert eine Änderung des Membranpotentials der β -Zellen und es kommt *via* Exozytose zur Ausschüttung des intrazellulär in Vesikeln gespeicherten Insulins (Dai et al., 2012). Die Halbwertszeit des Insulins im Plasma beträgt 4 bis 6 Minuten. Dadurch ist eine schnelle Anpassung der Insulinsekretion an Veränderungen der Blutglukosekonzentration möglich (Duckworth, Bennett, & Hamel, 1998). In der Leber drosselt Insulin die Glukagonsynthese und die Glykolyse. Die antagonistisch wirksamen Hormone hingegen setzen über Glukoneogenese und Glycogenabbau Glukose frei. Des Weiteren sind an der Regulation des Blutglukosespiegels das neuroendokrine System, Amylin (Insel-Amyloid-Polipeptid, IAPP) und Inkretin (gastrointestinalen Ursprungs) beteiligt (Jellinger, 2011). Unter physiologischen Bedingungen ist der Körper in der Lage sowohl einen Mangel als auch einen Überschuss an Glukose zu vermeiden. Bei einem unbehandelten oder ungenügend kontrollierten DM kommt es zu einer chronischen Hyperglykämie, da die Zellen des Zielgewebes entweder aufgrund eines Insulinmangels die Glukose nicht aufnehmen können oder wegen einer peripheren Insulinresistenz nur eine unzureichende Verwertung der Glukose stattfindet (Abbildung 1). Die Hypoglykämie kann besonders schnell zu einer Störung des zentralen Nervensystems und des Gehirns führen und unter anderem durch eine zu hohe Insulindosis verursacht werden.

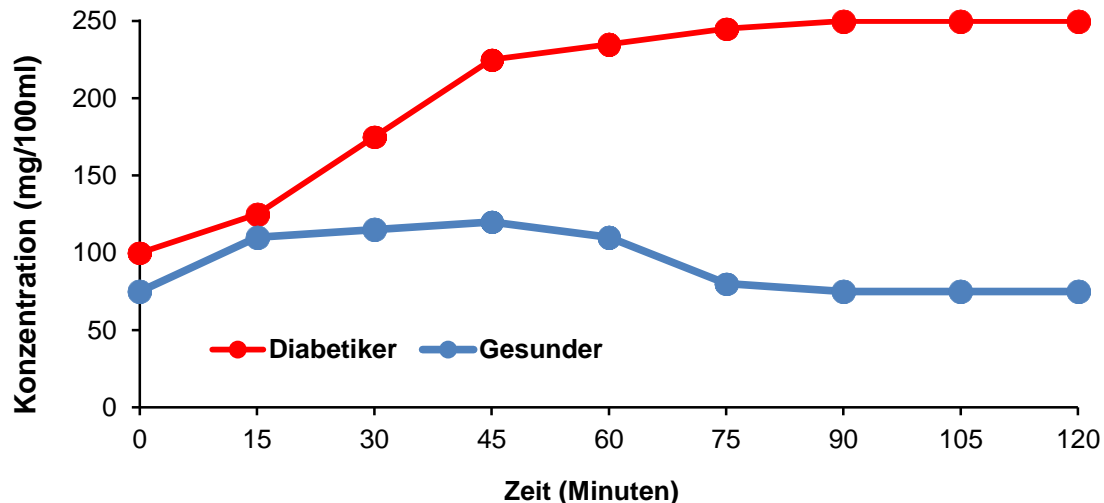


Abbildung 1: Blutglukosegehalt nach der oralen Gabe von 75 g Glukose (Grafik basierend auf Kerner & Brückel, 2011).

Infolge der chronischen Hyperglykämie ist DM mit einer Vielzahl von Folgeerkrankungen assoziiert, wobei die Augen, die Nieren, das Nervensystem, das Herz und die Blutgefäße besonders häufig betroffen sind (ADA, 2010). So gehen eine erhöhte Infektionsanfälligkeit (Mancini & Ruotolo, 1997) und eine verzögerte Wundheilung (Rosenberg, 1990) oft mit dieser Erkrankung einher. Symptome, welche eine permanente Hyperglykämie begleiten, sind Polyurie, Polydipsie, Gewichtsverlust und Verlust der Sehkraft (ADA, 2010; Kerner & Brückel, 2011). Akute lebensbedrohliche Komplikationen stellen vor allem die Hyperglykämie mit schwerer Ketoazidose und das hyperosmolare Syndrom dar (ADA, 2010). Bei den Langzeitkomplikationen handelt es sich besonders häufig um Retinopathien, Nephropathien und periphere Neuropathien. Diabetiker zeigen eine erhöhte Inzidenz von artherosklerotischen, kardiovaskulären, peripher arteriellen und cerebrovaskulären Erkrankungen (ADA, 2010).

1997 veröffentlichte *The American Diabetes Association* (ADA) eine neue Klassifikation (Tabelle 1) für DM (ADA, 1997). Die WHO bestätigte diese Neuerungen und übernahm sie 2000 in ihre Leitlinien. Aktuelle Schätzungen der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) gehen von einer Prävalenz des bekannten DM von 7-8 % der erwachsenen Gesellschaft in Deutschland aus (Rathmann, 2011), während die *International Diabetes Federation* (IDF) die Prävalenz erkrankter Personen im Alter von 20 bis 79 Jahren in Deutschland auf bis zu 12 % schätzt (IDF, 2009).

Tabelle 1: Ätiologische Klassifikation von Diabetes mellitus (in verkürzter Form nach ADA 2010).

I. Typ 1 Diabetes mellitus
A. Immunvermittelt
B. Idiopathisch
II. Typ 2 Diabetes mellitus
III. Andere spezifische Formen
A. Genetische Defekte der B-Zellfunktion
B. Genetische Defekte der Insulinwirkung
C. Erkrankungen des exokrinen Pankreas
D. Endokrinopathien
E. Drogen oder medikamenteninduzierter Diabetes
IV. Gestationsdiabetes (GDM)

Die Mehrheit der diagnostizierten Diabetesfälle lässt sich in zwei Kategorien, den Typ 1 und den Typ 2 DM, unterteilen. Beim Typ 1 DM (früher auch insulinabhängiger Diabetes oder juveniler Diabetes) ist eine absolute Störung der Insulinproduktion die Ursache der Erkrankung. Man unterscheidet bei dieser Form zwei Subtypen, den immunologisch vermittelten und den idiopathischen Typ. Beim immunologisch vermittelten DM Typ 1 resultiert der absolute Insulinmangel aus einer immunologisch verursachten Destruktion der insulinproduzierenden β -Zellen in den Langerhans-Inseln. Die Geschwindigkeit der β -Zell-Zerstörung kann variabel sein und es lassen sich Marker dieser Autoimmunreaktionen im Blut nachweisen. Dazu gehören Inselzellantikörper, Insulinautoantikörper, Autoantikörper gegen Tyrosinphosphatase und Autoantikörper gegen die Glutamat-Decarboxylase der β -Zellen. Bei diesem Subtyp spielen genetische Faktoren eine prädisponierende Rolle (ADA, 2010). Im Gegensatz dazu lässt sich beim selteneren idiopathischen Typ 1 die Beteiligung eines autoimmunologischen Prozesses nicht nachweisen (ADA, 2010). Lediglich 5-10 % aller Diabetiker sind dem Typ 1 zuzuordnen (ADA, 2010). Bei der anderen, prävalenteren Kategorie (90-95 % der Diabetiker), dem Typ 2 (früher auch als Altersdiabetes bezeichnet), ist die Ursache der Erkrankung eine Kombination aus der Resistenz gegenüber der Insulinwirkung und einer gestörten Insulinsekretion, wodurch ein relativer Insulinmangel entsteht (ADA, 2010; Kerner & Brückel, 2011). Das Risiko an dieser Form des Diabetes zu erkranken steigt mit dem Alter, dem Gewicht und dem Mangel an körperlicher Betätigung (ADA, 2010). Die genetische Prädisposition ist ausgeprägter als beim Typ 1 DM (ADA, 1997). Es werden noch weitere spezifische Typen des Diabetes und Gestationsdiabetes

(GDM) unterschieden. Bei den spezifischen Typen des DM handelt es sich zum größten Teil um Formen bei denen die Hyperglykämie aus einem genetischen Defekt resultiert. GDM ist als gestörte Glukosetoleranz definiert, die entweder erstmals oder nur während der Schwangerschaft auftritt (ADA, 2010). Nach Angaben der ADA kompliziert der GDM 7 % aller Schwangerschaften (ADA, 2004). Eine weitere Kategorie bilden Patienten mit einem Grad an Hyperglykämie, der zwar zu pathologischen und funktionellen Veränderungen in verschiedenen Geweben führt, es jedoch nicht zur Manifestation chronischer Symptomen kommt. Diese Patienten haben eine abnorme Nüchtern-Plasmaglukose (*impaired fasting glucose*, IFG) mit Werten von 100 mg/dl (5,6 mmol/l) bis 125 mg/dl (6,9 mmol/l) oder eine gestörte Glukosetoleranz (*impaired glucose tolerance*, IGT). Bei einer IGT liegen die 2-Stunden-Werte des oralen Glukosetoleranztests (OGTT) zwischen 140 mg/dl (7,8 mmol/l) und 199 mg/dl (11,0 mmol/l). Patienten mit IGT oder IFG unterliegen einem erhöhten Risiko der Manifestation eines DM (ADA, 2010).

Zur Diagnose eines DM können verschiedene Kriterien herangezogen werden (Tabelle 2). So stellen ein HbA1c-Wert $\geq 6,5$ oder Nüchtern-Plasmaglukosewerte über ≥ 126 mg/dl (≥ 7 mmol/l) primäre Diagnosekriterien dar. Zudem spricht eine Hyperglykämie mit einer Gelegenheits-Plasmaglukose über 200 mg/dl (11,1 mmol/l) ohne kausalen Zusammenhang mit einer Kohlenhydrataufnahme für das Vorliegen eines DM. Eine weitere Diagnosemöglichkeit ist der orale Glukosetoleranztest (OGTT) nach den Kriterien der WHO. Der nüchterne Teilnehmer trinkt bei diesem Test innerhalb von 5 Minuten 75 g Glukose in 250-300 ml Wasser. Der Blutzuckerwert wird vor und zwei Stunden nach Glukoseaufnahme bestimmt, wobei ein 2-Stunden-Wert ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) ein Diagnosekriterium für DM darstellt (ADA, 2010; Kerner & Brückel, 2011).

Tabelle 2: Diagnosekriterien für Diabetes mellitus nach der Deutschen Diabetes Gesellschaft.

-
1. HbA1c $\geq 6,5$ % (≥ 48 mmol/mol)
 2. Gelegenheits-Plasmaglukosewerte von ≥ 200 mg/dl ($\geq 11,1$ mmol/l)
 3. Nüchtern-Plasmaglukosewert von ≥ 126 mg/dl ($\geq 7,0$ mmol/l)
 4. OGTT-2-h-Wert im venösen Plasma ≥ 200 mg/dl
-

OGTT: oraler Glukosetoleranztest.

Bei einigen Patienten kann eine adäquate Glukosekontrolle durch die Reduzierung des Körpergewichts und die Einnahme oraler Antidiabetika erreicht werden. Diese Patienten sind nicht von externer Insulinzufuhr abhängig. Individuen mit ausgeprägter Zerstörung der pankreatischen β -Zellen und ohne beziehungsweise mit einer deutlich

eingeschränkten Insulinrestproduktion benötigen die externe Insulinzufuhr aus vitalen Gründen.

Der Grad der Langzeiteinstellung eines Patienten mit DM wird über den prozentualen Anteil des glykierten Hämoglobins im Blut (HbA1c-Wert) ermittelt. Glykohämoglobin (HbA1c) stellt das kontinuierliche Produkt einer nichtenzymatischen Reaktion zwischen der primären Aminogruppe eines Hämproteins der Erythrozyten und Glukose dar. Die Glukolysierung des Hämoglobins ist permanent und bleibt daher über die gesamte Lebensdauer des Erythrozyten erhalten. Mit erhöhten Blutglukosekonzentrationen steigt auch die Konzentration des HbA1c. Die Konzentration des HbA1c dient somit der klinischen Überwachung der Langzeiteinstellung und des Blutzuckerhaltens der letzten 2-8 Wochen. Die DDG formuliert als ideales Therapieziel einen HbA1c-Wert $< 6,5\%$ und Blutglukosewerte von 90–120 mg/dl (nüchtern und präprandial) (Matthaei, 2011).

2.2 Parodontopathien und ihre Verlaufsformen

Im Parodont lassen sich verschiedene Entzündungszustände des Gewebes differenzieren, die als Gingivitis beziehungsweise Parodontitis kategorisiert werden. Im Jahr 1999 wurde auf dem *International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions* eine neue Klassifizierung der Parodontalerkrankungen eingeführt, welche acht verschiedene Erscheinungsformen differenziert (Armitage, 1999) (Tabelle 3).

Tabelle 3: Klassifikation der Parodontalerkrankungen (Armitage, 2000).

I.	Gingivale Erkrankungen (G)
II.	Chronische Parodontitis (CP)
III.	Aggressive Parodontitis (AP)
IV.	Parodontitis als Manifestation einer Systemerkrankung (PS)
V.	Nekrotisierende Parodontalerkrankungen (NP)
VI.	Parodontalabszesse
VII.	Parodontitis im Zusammenhang mit endodontalen Läsionen
VIII.	Entwicklungsbedingte oder erworbene Deformationen und Zustände

Im Weiteren soll auf die Gingivitis und die chronische Parodontitis näher eingegangen werden, da die Teilnehmer der vorliegenden Studie an diesen beiden Erkrankungen litten.

Bei der Gingivitis ist das marginale Gewebe, insbesondere das Saumepithel, von einer Entzündung erfasst. Histologisch lassen sich bei der Gingivitis eine initiale, eine frühe und eine etablierte Läsionsform unterscheiden, die den jeweiligen Schweregrad des Entzündungszustandes des Gewebes widerspiegeln (Page & Schroeder, 1976). Eine chronische Gingivitis ist nach Entfernung des Biofilms vollständig reversibel (Lindhe, Hamp, & Loe, 1975), wohingegen die Parodontitis (fortgeschrittene Läsionsform) durch einen irreversiblen Attachmentverlust charakterisiert ist und unbehandelt zum Zahnverlust führen kann (Page & Schroeder, 1976). Der als orale Plaque oder Biofilm bezeichnete supra- beziehungsweise subgingivale mikrobielle Belag auf der Zahnoberfläche und den Geweben des Parodonts stellt die primäre Ursache beider Erkrankungen dar. Dieser Biofilm besteht zum größten Teil aus Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukten (Listgarten, 1994), welche einen großen Einfluss auf den Zustand des Gewebes ausüben und zu einer deutlichen Immunreaktion führen (Kornman, Page, & Tonetti, 1997). Durch den Biofilm wird das Saumepithel zunächst aufgelockert, wodurch es dem Bakterienwachstum möglich wird sich insbesondere subgingival weiter auszudehnen. Im Rahmen der lokalen Immunreaktion des Wirts werden verschiedene Entzündungsmediatoren freigesetzt, die zu einer Steigerung der Gefäßpermeabilität und damit zur Exsudation aus dem Sulcus führen. Dies äußert sich in einer erhöhten Sulcusflüssigkeits-Fließrate (SFFR) (Darany, Beck, & Walters, 1992). Im Verlauf ändert sich neben der Quantität der durch reichliche Substratzufuhr aus der Sulcusflüssigkeit schneller wachsenden Plaque auch die qualitative Zusammensetzung des Biofilms hin zu einem eher anaeroben Charakter (Listgarten, 1994). Innerhalb von zwei bis vier Tagen nach der ersten Plaqueakkumulation entsteht die initiale Läsion (Page & Schroeder, 1976). Durch chemotaktisch wirksame Substanzen exogenen oder endogenen Ursprungs angelockt, gelangen polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) als phagozytische Zellen an den Ort dieser Entzündung (Lamster, 1997) und errichten einen Leukozytenwall zwischen Epithel und Biofilm (Theilade & Attström, 1985). Wird dieser Wall von den Pathogenen überwunden, können sie in das umliegende Gewebe eindringen und die Entzündung schreitet weiter voran. Es entstehen Ulzerationen im Saumepithel und weitere Immunzellen wandern ein. Die frühe Läsionsform ist durch eine zunehmende Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen sowie der beginnenden Zerstörung der gingivalen Kollagenfasern gekennzeichnet und entsteht vier bis sieben Tage nach der ersten Plaqueakkumulation. Nach zwei bis drei Wochen geht die frühe in die etablierte Läsion über, die dem Zustand einer chronischen Gingivitis entspricht. Dieser Zustand kann über einen langen Zeitraum stabil bleiben. Histologisch dominieren antikörperproduzierende Plasmazellen und die Zerstörung der gingivalen Kollagenfasern schreitet weiter voran, bleibt aber auf die

Gingiva beschränkt (Page & Schroeder, 1976). Aus dem Saumepithel entsteht ein Taschenepithel und die Gingivitis geht in eine Parodontitis (fortgeschrittenen Läsion) über (Abbildung 2). Bei der Parodontitis dominieren histologisch ebenfalls Plasmazellen (Berglundh & Donati, 2005). Im Gegensatz zur Gingivitis betrifft die Zerstörung des Gewebes alle Anteile des Zahnhalteapparates. Es kommt zur Ausbildung einer parodontalen Tasche mit voranschreitendem Attachment- und Knochenverlust (Page & Schroeder, 1976). Aktuell geht man davon aus, dass dieser Vorgang von der individuellen Immunreaktion des Wirts und von dessen Risikofaktoren beeinflusst wird. Systemische Erkrankungen wie DM, verschiedene Medikamente und Mangelernährung können den Verlauf und die Ausprägung gingivaler und parodontaler Erkrankungen beeinflussen. Auch persönliches Verhalten und Lebenswandel, Umwelteinflüsse oder angeborene und vererbte Eigenschaften stellen Risikofaktoren dar (Salvi, Lawrence, Offenbacher, & Beck, 1997).

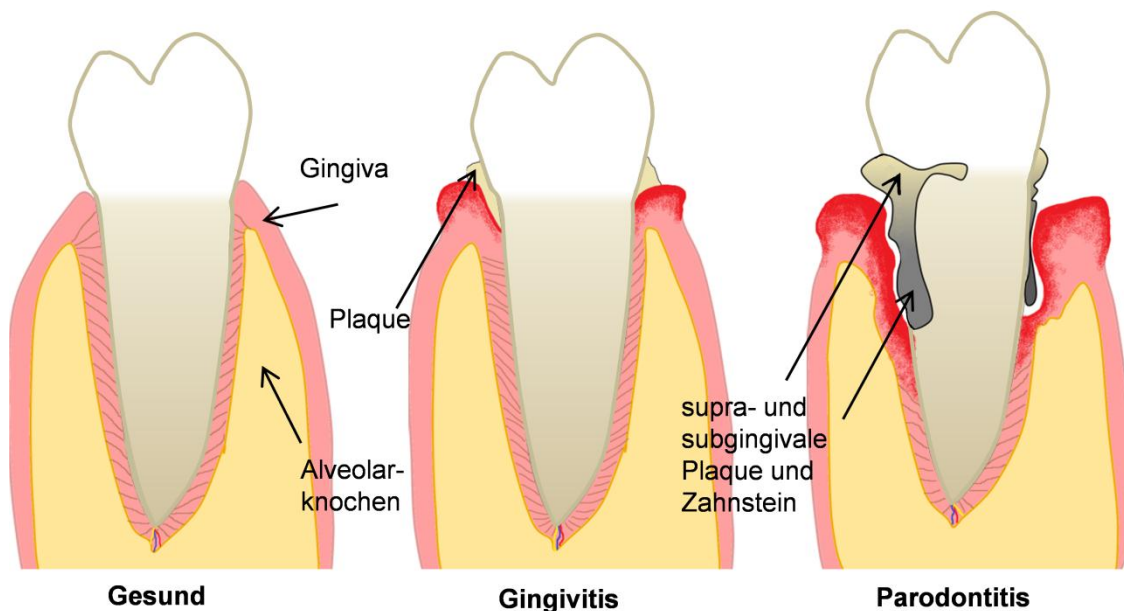


Abbildung 2: Entzündungszustände des Parodonts.

2.3 Sulcusflüssigkeits-Fließrate (SFFR)

1958 beschrieben BRILL UND KRASSE die Sulcusflüssigkeit (SF) erstmals als ein Filtrat der gingivalen Kapillaren, welches sich aus klinisch entzündungsfreien Parodontien gewinnen lässt (N. Brill, Krasse, O.B., 1958). Nach weiterer Charakterisierung wurde die SF von Parodontitis- und Gingivitispatienten als ein inflammatorisches Exsudat beschrieben (Cimasoni, 1983; Del Fabbro et al., 2001; Lamster, 1997; Loe & Holm-

Pedersen, 1965). Aufgrund der Zusammensetzung, dem diagnostischen Potenzial und der noninvasiven Entnahmemöglichkeit steht die SF seit Jahren im Mittelpunkt vieler parodontologischer Studien. Die SF enthält neben zellulären und organischen Bestandteilen verschiedene Elektrolyte (Bang, Cimasoni, Rosenbusch, & Duckert, 1973; Cimasoni, 1983). Die zellulären Komponenten sind neben abgeschilferten Epithelzellen (Attström, 1975)(Attström, 1975) und Bakterien (Griffiths, Wilton, & Curtis, 1992) vor allem Leukozyten (Nakashima, Demeurisse, & Cimasoni, 1994). Bei den organischen Bestandteilen handelt es sich um Metaboliten des Kollagenstoffwechsels, Polypeptide (Cho, Garant, & Lee, 1984), Hydroxyprolin (Hara & Takahashi, 1975), Proteoglykane und Glykosaminglykane (Embery, Oliver, Stanbury, & Purvis, 1982; Last, Stanbury, & Embery, 1985) sowie um viele weitere Proteine (Carneiro, Venuleo, Oppenheim, & Salih, 2012). Diese Substanzen werden maßgeblich nach dem Kontakt von Bakterien mit Immunzellen und ortsständigen Zellen freigesetzt. Durch Granulozyten freigesetzt, gelangen unter anderem Elastase, Kollagenase, β -Glucuronidase und Myeloperoxidase in die SF (Carneiro et al., 2012; Gustafsson, Asman, Bergstrom, & Soder, 1992). Erhöhte Konzentrationen dieser Enzyme in der SF weisen auf eine Entzündung der Gingiva beziehungsweise des Parodonts hin (Bickel & Cimasoni, 1985; Gustafsson et al., 1992; Teles et al., 2010). Die SF enthält neben Leukozyten weitere immunologisch aktive Komponenten wie IgG, IgA, IgM (Holmberg & Killander, 1971; Shillitoe & Lehner, 1972) und Komplementfaktoren (Shillitoe & Lehner, 1972). Das Komplementsystem ist ein komplexes Kaskadensystem zu dessen Bestandteilen die proteolytischen Plasmaproteine C1 bis C9 gehören. Die drei Wirkmechanismen des Komplementsystems sind Opsonisierung, Chemotaxis und Zelllyse. Es kann über verschiedene Mechanismen aktiviert werden. Der klassische Aktivierungsweg wird durch die Bindung von C1 an einen Antigen-Antikörperkomplex ausgelöst. C1 bindet dabei an die Fc-Region von IgM oder IgG und es kommt zur Auslösung der Kaskade. Durch proteolytische Spaltung entsteht der chemotaktisch wirksamen Faktor C5a, der weitere Phagozyten anlockt (Van Dyke & Hoop, 1990). Das Opsonin C3b markiert das Molekül und erleichtert die Phagozytose (Van Dyke & Hoop, 1990). Die Faktoren C5b und C6 bis C9 bilden den Membranangriffskomplex, der in der Membran des Antigens eine Pore formt und dieses durch Osmose zerstört. Beim alternativen Aktivierungsweg kommt es zu einer direkten Anlagerung des Faktors C3b an mikrobielle Oberflächen.

Die Zusammensetzung und die kontinuierliche Abgabe von SF, durch die Bakterien und andere Schadstoffe aus dem *Sulcus gingivae* herausgespült werden, verdeutlicht ihre wichtige Rolle bei der lokalen Abwehr im Parodont (Page, 1986). Die SFFR hängt dabei von der vaskulären Permeabilität der gingivalen Kapillaren (N. Brill, 1959b) und

dem Schweregrad der Entzündung ab. Mit steigendem Entzündungsgrad nimmt auch die SFFR zu (Darany et al., 1992; Teles et al., 2010), die dadurch als ein Indikator für entzündliche Veränderungen im parodontalen Gewebe gilt (Del Fabbro et al., 2001; Griffiths, Sterne, Wilton, Eaton, & Johnson, 1992; Loe & Holm-Pedersen, 1965). Zudem wird die SFFR von verschiedenen anderen Faktoren wie zirkadianen Schwankungen (Bissada, Schaffer, & Haus, 1967), weiblichen Sexualhormonen (Fessler, 1977; Lindhe, Attström, & Bjorn, 1969; Markou, Eleana, Lazaros, & Antonios, 2009), Tabakkonsum (Morozumi, Kubota, Sato, Okuda, & Yoshie, 2004) und mechanischer Irritation der Gingiva beeinflusst (N. Brill, 1959a). Liegt eine entzündliche Veränderung vor, werden durch Produkte der Mikroorganismen, wie beispielsweise Endotoxine, Kollagenasen, Proteasen und Chondroitinsulfatasen, die gingivalen Bindegewebszellen und Epithelzellen sowie interzelluläre Substanzen geschädigt (Caffesse & Nasjleti, 1976; Schwartz, Stinson, & Parker, 1972). Es resultieren vergrößerte Interzellularräume, durch die das Eindringen weiterer pathogener Mikroorganismen erleichtert wird und das entzündlich veränderte Saumepithel zur Eintrittspforte für weitere Toxine und invasive Mikroorganismen wird (Attström, 1975; Caffesse & Nasjleti, 1976; Saglie, Newman, Carranza, & Pattison, 1982; Schwartz et al., 1972). Die Abwehrfähigkeit gegen die eindringenden mikrobiellen Noxen hängt nun von der Funktionsfähigkeit des zellulären und humoralen Immunsystems des Wirtes ab. Durch bakterielle Endotoxine oder Komplementfaktoren angelockt, verlassen die neutrophilen Granulozyten und Monozyten die dento-alveolären Kapillaren und gelangen durch Chemotaxis zum Ort der Entzündung (Attström, 1975). Es entsteht eine kontinuierliche Migration der Zellen in das Saumepithel und den *Sulcus gingivae* (Attström & Egelberg, 1970). Unabhängig vom Entzündungsgrad stellen neutrophilen Granulozyten bei diesem Vorgang die dominierende Zellpopulation dar und weniger als 5 % der einwandernden Zellen sind den mononukleäre Zellen zuzurechnen (Attström, 1970).

Um die Zusammensetzung der SF analysieren und die SFFR bestimmen zu können, sind verschiedene Entnahmemethoden entwickelt worden. Neben der intra- und extrasulculären Entnahme mittels Filterpapierstreifen kann eine Probenentnahme auch durch Waschung des *Sulcus gingivae* erfolgen (Guentsch et al., 2011). So wird bei der 1976 von SKAPSKI UND LEHNER entwickelten Methode der Sulcus beziehungsweise die parodontale Tasche durch mehrfaches aspirieren von 10 µl phoshatgepufferter Kochsalzlösung mittels Mikrospritze gespült. Dieses Verfahren wurde insbesondere zur Gewinnung von Leukozyten genutzt (Golub, Iacono, Nicoll, Ramamurthy, & Kaslick, 1981; Golub, Nicoll, Iacono, & Ramamurthy, 1982; Iacono, Singh, Golub, Ramamurthy, & Kaslick, 1985). MEYLE entwickelte 1986 eine weitere Spülmethode zur Gewinnung von

Granulozyten aus dem *Sulcus gingivae* und verglich diese mit dem Verfahren nach SKRAPSKI UND LEHNER. Das neue Verfahren erwies sich als zellschonender und daher geeigneter zur Granulozytengewinnung. Eine vertiefende Darstellung dieser Methode erfolgt im Kapitel Materialien und Methoden.

2.4 Diabetes mellitus als Risikofaktor für Parodontitis

Parodontitis gilt als eine Komplikation bei DM (Löe, 1993) und zahlreiche Studien identifizieren DM als einen Risikofaktor für Parodontalerkrankungen. Der Zusammenhang zwischen den beiden Erkrankungen ist dabei bidirektional. Demnach kann die Diabeteserkrankung Einfluss auf die parodontale Gesundheit haben sowie die Einstellung eines Diabetikers durch eine Parodontitis beeinflusst werden (Deschner et al., 2011; Lalla & Papapanou, 2011; Mealey & Rethman, 2003). Bei der Untersuchung des Zusammenhanges zwischen Markern der metabolischen Kontrolle und parodontalen Erkrankungen bei Diabetikern, kamen LIM ET AL. (2007) zu dem Ergebnis, dass der Grad der glykämischen Langzeiteinstellung, ausgedrückt durch den HbA1c-Wert, den größten Risikofaktor für die Progression und den Schweregrad einer parodontalen Erkrankung darstellt. So zeigen Patienten mit einem schlecht eingestellten HbA1c-Wert eine deutlich höhere Prävalenz für Gingivitis und Parodontitis als Patienten mit einem gut eingestellten Diabetes und gesunde Probanden (Campus, Salem, Uzzau, Baldoni, & Tonolo, 2005; Karjalainen & Knuuttila, 1996).

In diesem Zusammenhang sind besonders Studien mit großen Stichprobenumfängen hervorzuheben. So wurden in der in den USA durchgeführten *National Health and Nutrition Examination Study III* (NHANES III) die Daten von 4343 Erwachsenen analysiert. Es wurde festgestellt, dass Typ 2 Diabetiker mit einem HbA1c-Wert $> 9,0\%$ eine höhere Prävalenz für schwere chronische Parodontitis zeigen als gesunde Kontrollpersonen, wohingegen sich bei Patienten mit einem HbA1c-Wert $\leq 9,0\%$ statistisch kein erhöhtes Risiko für Parodontitis zeigte (Tsai, Hayes, & Taylor, 2002). Bei einer weiteren in den USA durchgeführten epidemiologischen Studie wurde der Zusammenhang zwischen DM Typ 2 und oraler Gesundheit an einem Stamm von amerikanischen Ureinwohnern aus Arizona (Pima-Indianer) untersucht. Der untersuchte Stamm zeigt eine besonders hohe Inzidenz und Prävalenz für DM Typ 2. Neben Alter und Geschlecht wurden die parodontologische Parameter Attachmentlevel, Knochenverlust, Zahnsteinindex, Plaqueindex und Gingivaindex bei 1342 Angehörigen dieses Stammes erfasst. Die Studie kam zu dem Ergebnis, dass DM Typ 2 unabhängig von Alter, Geschlecht und Mundhygiene, das Risiko für Attachmentverlust und alveolären Knochenverlust

eindeutig steigert (Emrich, Shlossman, & Genco, 1991). Diese Ergebnisse wurden durch eine longitudinale Studie an 362 Angehörigen desselben Stammes bestätigt. Über den Zeitraum von zwei Jahren wurde der alveoläre Knochenverlust mit Hilfe von Panoramaschichtaufnahmen dokumentiert. Auch hier wurde ein erhöhter alveolärer Knochenverlust bei den Diabetikern festgestellt (G. W. Taylor et al., 1998). Eine aktuelle Metaanalyse zu dem Zusammenhang zwischen DM und Parodontitis kam zu dem Ergebnis, dass die Differenz des klinischen Attachmentverlustes zwischen Patienten mit DM Typ 2 und systemisch Gesunden 1 mm beträgt, wohingegen bei Typ 1 DM keine eindeutigen Unterschiede gefunden wurden (Chavarry, Vettore, Sansone, & Sheiham, 2009).

In der aktuellen Literatur finden sich sowohl für Typ 2 als auch für Typ 1 DM Studien, welche auf eine veränderte Reaktivität der Granulozyten und anderer primärer Immunzellen bei an Parodontitis und Diabetes erkrankten Patienten hinweisen. Veränderungen auf zellulärer Ebene sollen unter anderem zu einer erhöhten Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Zytokinen in den gingivalen Sulcus führen. So wurde in einer Studie die Konzentration von Interleukin (IL)-1 β in der SF in Abhängigkeit vom HbA1c-Wert der Patienten mit Typ 2 DM und chronischer Parodontitis untersucht. Bei Patienten mit einem HbA1c > 8 % konnten wesentlich höhere Konzentrationen an IL-1 β nachgewiesen werden als bei Patienten mit einem HbA1c \leq 8 %. Die klinischen Messdaten für die Sondierungstiefe, die Sondierungsblutung und das Attachmentlevel korrelierten mit dem IL-1 β -Werten in der SF (Engelbreton et al., 2004).

Im Gegensatz dazu konnten ARAYA ET AL. (2003) keine Unterschiede hinsichtlich der Zytokinfreisetzung feststellen. Sie untersuchten Vollblutproben von 14 Typ 1 Diabetikern mit aggressiver Parodontitis (AP+/DM+) und von 15 Typ 1 Diabetikern ohne aggressive Parodontitis (AP-/DM+) hinsichtlich der Fragestellung, ob die durch Lipopolysaccharide (LPS) induzierte Zytokinproduktion und Prostaglandin E₂ (PGE₂)-Freisetzung Unterschiede aufzeigt. PGE₂ wurde mit einem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) und die Zytokine mittels Chemilumineszenz gekoppelten Enzymimmunoassays nachgewiesen. Es konnten keine erhöhten Konzentrationen für TNF α , IL-1 β und IL-6 in den beiden Diabetesgruppen nachgewiesen werden. Ebenso wurden im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe keine Unterschiede festgestellt. Die Konzentration an PGE₂ war jedoch bei AP+/DM+ und AP-/DM+ im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht.

SALVI ET AL. (1997) kamen einige Jahre zuvor zu einem ähnlichen Ergebnis. Sie untersuchten die SF von 39 insulinabhängigen Diabetikern (Typ 1 DM) um die darin enthaltenen Konzentrationen der proinflammatorischen Marker PGE₂ und IL-1 β zu be-

stimmen und diese dann mit den Proben von 64 diabetesfreien Parodontitispatienten zu vergleichen. Dabei wurden die insulinabhängigen Diabetiker in eine Gruppe mit Gingivitis bis leichte Parodontitis (Gruppe A) und in eine Gruppe mit mittlerer bis schwerer parodontaler Erkrankung (Gruppe B) eingeteilt. Bei beiden Gruppen war eine erhöhte Konzentration der Entzündungsmediatoren nachzuweisen. Die Werte der Gruppe B waren im Vergleich zu den Werten der Gruppe A höher. Bei der Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an LPS der Keime *Escherichia coli* und *Porphyromonas gingivalis* war die monozytäre Ausschüttung an PGE₂ bei den Diabetikern dreimal höher als bei den Nichtdiabetikern. Die IL-1 β Konzentrationen zeigten hingegen keine Unterschiede. Das Volumen und die Konzentration der Mediatoren zeigte bei diesem Experiment keine Korrelation mit den HbA1c-Werten.

Die durch DM bedingte Hyperglykämie beeinflusst verschiedene Zellmechanismen. Unter anderem wird durch die erhöhte Glukosekonzentration in Blut und Gewebe die *de novo* Synthese von Diacylglyceriden (DAGs) gefördert. DAGs aktivieren die Proteinkinase C (PKC) und könnten somit zu einer erhöhten Superoxidausschüttung führen. In einer hyperglykämischen Umgebung werden zudem viele Proteine nicht-enzymatisch glykiert und damit zu sogenannten *advanced glycated endproducts* (AGEs). Die AGEs reichern sich im Plasma und Gewebe der Diabetiker an (Makita, Vlassara, Cerami, & Bucala, 1992), wo sie zu pathologischen Veränderungen führen. Makrophagen und Monozyten besitzen Rezeptoren für AGEs, die als RAGEs (*Receptor-AGEs*) bezeichnet werden (Collison et al., 2002). Die Interaktion von AGEs und RAGEs führt zur Aktivierung von Monozyten und Makrophagen, die daraufhin proinflammatorische Zytokine freisetzen (Lalla, Lamster, & Schmidt, 1998; Lalla & Papapanou, 2011). Des Weiteren kommt es zu oxidativem Stress in den Zellen, der zu vaskulären Entzündungen führt. Aufgrund dieser Auswirkungen und der Aktivierung von Thrombozyten können AGEs die Entstehung und Progression vaskulärer Komplikationen bei Diabetikern begünstigen (Lalla & Papapanou, 2011; Yamagishi, 2011). Auch Fibroblasten und Osteoblasten scheinen in ihrer Aktivität von AGEs beeinflusst zu werden (Lalla & Papapanou, 2011). Eine Studie deutet darauf hin, dass PMN ebenfalls RAGEs auf ihrer Plasmamembran exprimieren. Diese Rezeptoren sollen bei Aktivierung einen intrazellulären Ca²⁺-Anstieg und Aktinpolymerisation auslösen. Nach den Autoren dieser Studie kommt es durch die Interaktion von RAGEs und AGEs zu einer Beeinflussung der Zellfunktionen der PMN, was sich in einer verminderten chemotaktischen Migration und einer gesteigerten Phagozytose widerspiegelte (Collison et al., 2002). PMN von Patienten mit schlechter (HbA1c > 8 %) und moderater (HbA1c 7,0 %-8,0 %) glykämischer Kontrolle zeigten nach Stimulierung mit N-formyl-Methionyl-Leucyl-

Phenylalanin (fMLF) oder Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) eine höhere Aktivität von freier und membrangebundener PKC als PMN von gesunden Individuen. Die PMN von Diabetikern mit guter glykämischer Kontrolle ($\text{HbA1c} < 7\%$) hingegen zeigen keine Steigerung der PKC-Aktivität (Karima et al., 2005). Die PKC katalysiert die Phosphorylierung der p47phox Untereinheit des NADPH-Oxidase-Komplexes, welcher die Generation von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) katalysiert. So zeigen die Leukozyten von diabetischen Patienten im Vergleich zu Zellen gesunder Kontrollen eine gesteigerte O_2^- /Peroxid-Freisetzung (Devaraj & Jialal, 2000; Karima et al., 2005), wobei dieses Phänomen in Zusammenhang mit dem HbA1c-Wert zu stehen scheint (Karima et al., 2005).

An diabetischen Mäusen konnten SIMA ET AL. (2010) mit Hilfe von gingivaler intravitale Mikroskopie nachweisen, dass chronische Hyperglykämie die Vasopermeabilität steigert und die Anzahl der am Endothel entlangrollenden Leukozyten im Vergleich zum gesunden Zustand eindeutig höher ist ($p < 0,03$). Zudem stellten sie eine Tendenz für eine gesteigerte Expression des für die Diapedese wichtigen Leukozytenoberflächenantigens CD11a fest. CD11a bildet zusammen mit CD18 das Leukozytenintegrin LFA-1, welches bei Bindung an seine Liganden das Rollen der Leukozyten am Endothel vermittelt. Die Arbeitsgruppe schlussfolgerte daraus, dass chronische Hyperglykämie einen proinflammatorischen Zustand in der Mikrozirkulation des gingivalen Gewebes induziert, der durch eine gesteigerte Vasopermeabilität und Voraktivierung des Endothels sowie der Leukozyten gekennzeichnet ist. Dieser proinflammatorische Zustand könnte zu einer gesteigerten Zerstörung parodontalen Gewebes führen.

NASSAR, KANTARCI UND VAN DYKE kamen 2007 zu dem Schluss, dass parodontale Erkrankungen einen direkten Effekt auf den diabetischen Status haben. Die Aktivierung der angeborenen Immunabwehr spielt bei beiden Erkrankungen eine entscheidende Rolle. Bei Diabetes wird die Immunantwort vor allem durch die AGEs beeinflusst, die zu einer Aktivierung der PKC- α und - β der Neutrophilen und Monozyten führen. Durch die Aktivierung der PKCs kommt es zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, wie IL-1 β , Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Matrix-Metallo-Proteinase (MMPs), PGE₂ und Leukotriene B₄ (LTB₄), sowie zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) und damit zu entzündlichen Prozessen im Gewebe. Die entzündlichen Prozesse können die glykämische Kontrolle durch eine entstehende Insulinresistenz komplizieren (Abbildung 3). Potentiell könnten diese Prozesse durch die Anwendung antiinflammatorischer Mediatoren blockiert werden.

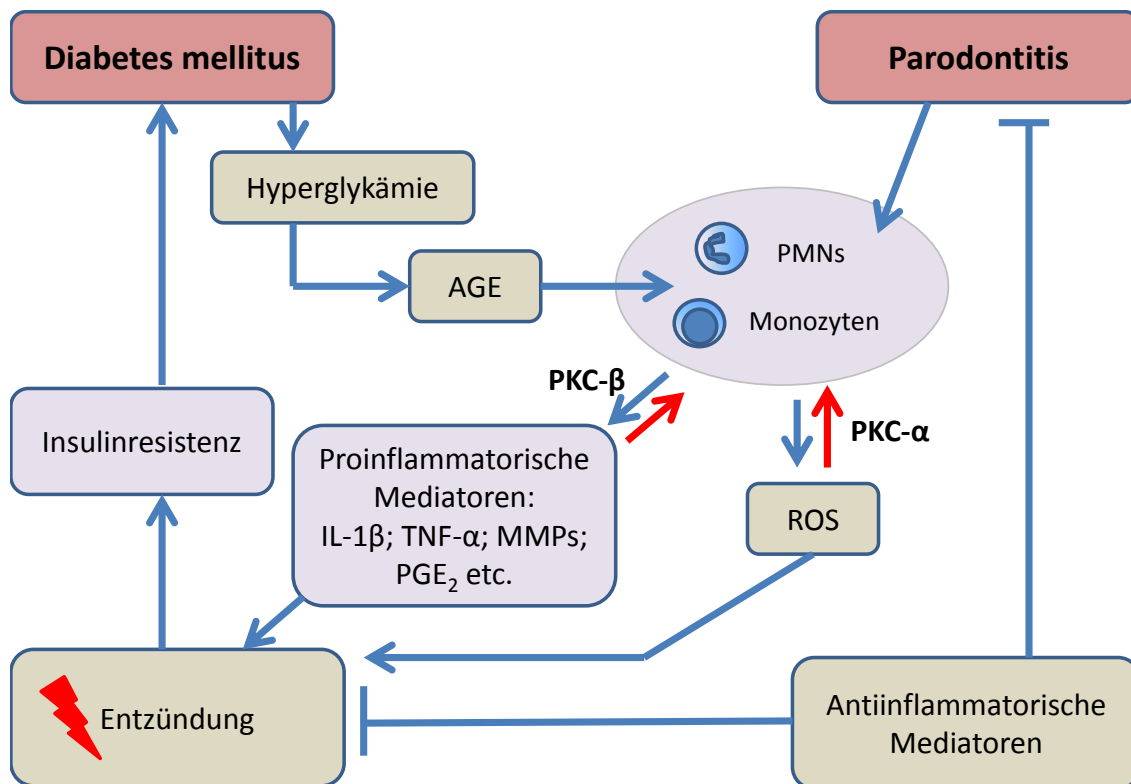


Abbildung 3: Stoffwechselweg diabetischer Parodontitispatienten nach Nassar et al. (2007). AGE: nicht-enzymatisch glykierte Proteine (*advanced glycated endproducts*); IL-1β: Interleukin-1β; MMPs: Matrix-Metallo-Proteinasen; PGE₂: Prostaglandin E2; PKC: Proteinkinase; PMNs: polymorphkernige neutrophile Granulozyten; ROS: Reaktive Sauerstoffverbindungen; TNF-α: Tumornekrosefaktor-α.

Als ein weiterer Pathomechanismus für die Assoziation zwischen Parodontitis und DM Typ 2 wird der veränderte Adipokinspiegel bei Diabetikern diskutiert. Adipokine (auch als Adipozytokine bezeichnet) sind von Adipozyten sezernierte Zytokine wie IL-1β, IL-6, TNF-α und Adiponektin. Die meisten dieser Zytokine haben eine proinflammatorische Wirkung (IL-1β, IL-6 und TNF-α) und induzieren in der Leber die Produktion Akuter Phase Proteine wie C-reaktives Protein (CRP). Bei den meisten Patienten mit DM Typ 2 liegt aufgrund von Übergewicht und Bewegungsmangel eine abnorme Erhöhung des Körperfettanteils vor. Dies führt zu einer vermehrten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch Adipozyten. Über das Blut verteilen sich die Zytokine im gesamten Körper und wirken somit systemisch. Durch die lokal erhöhten Zytokinspiegel im Fettgewebe werden zudem Makrophagen angelockt. Aktuell geht man davon aus, dass es dann im Fettgewebe zu einer Differenzierung der eingewanderten Makrophagen zu einem hyperinflammatorischen Phänoyp kommt, der als M1-Makrophagen bezeichnet wird und ebenfalls vermehrt proinflammatorische Zytokine sezerniert (Abbildung 4) (Donath & Shoelson, 2011). Die genannten proinflammatorischen Zytokine spielen auch bei Parodontitis eine wichtige Rolle (Lalla & Papapanou, 2011).

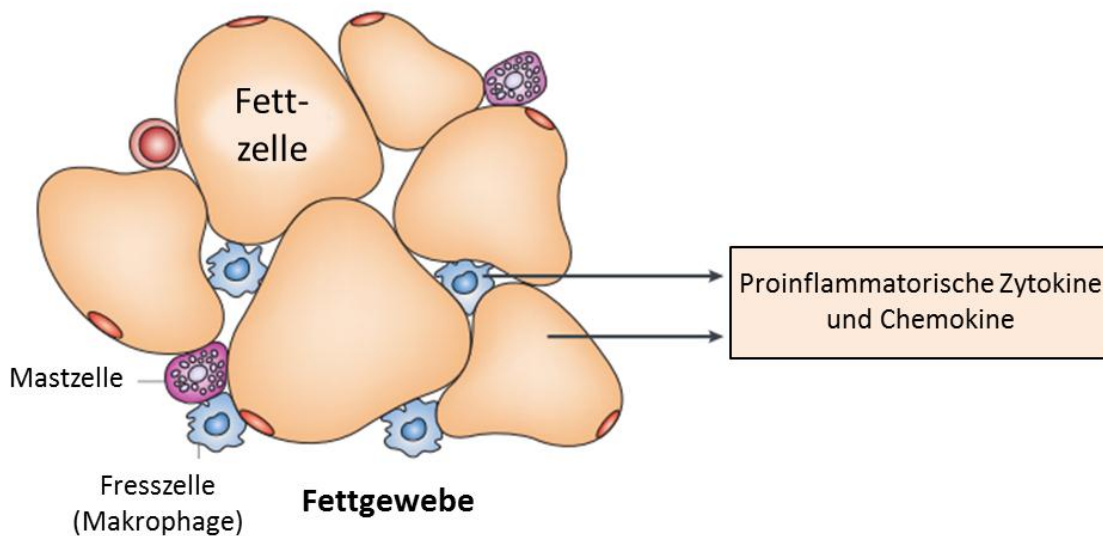


Abbildung 4: Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Adipozyten (nach Donath und Shoelson 2011).

Im Gegensatz zu den proinflammatorischen Zytokinen beeinflusst das ebenfalls von Adipozyten produzierte Adiponektin als negativer Regulator die Insulinwirkung sowie den Energieumsatz. Studien konnten zeigen, dass niedrige Adipokin-Serumspiegel mit Insulinresistenz und Typ 2 DM assoziiert sind (Inoue, Maehata, Yano, Taniyama, & Suzuki, 2005). Ein mittelbarer Einfluss von Adiponektin auf Entzündungsprozesse wird diskutiert und eine reduzierte Ausschüttung dieses Entzündungsprotektors bei Diabetikern oder übergewichtigen Patienten könnte die Parodontitis beeinflussen. So führt die parodontale Therapie von schlecht eingestellten Diabetikern Typ 2 zu einem Anstieg von Adiponektin im Serum und reduziert gleichzeitig den Spiegel inflammatorischer Adipozytokine wie hsCRP, TNF- α und Interleukin-6 (Sun et al., 2011).

2.5 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) sind die primären phagozytären Zellen der akuten Immunantwort (Van Dyke & Hoop, 1990). Sie stellen bei Gesunden mit einem relativen Anteil von 55-70 % den größten Anteil der im Blut zirkulierenden Leukozytenpopulation dar und Leukozytenzahlen im Bereich von 4000-10000 pro μl Blut werden als physiologisch eingestuft (Thomas, 2008). Unter dem Einfluss von *Granulocyte Colony Stimulating Factor* (G-CSF) werden aus den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks bei einem gesunden Menschen täglich 10^{11} bis 2×10^{11} Neutrophile gebildet (Borregaard, 2010; Dale, Boxer, & Liles, 2008). Nach Abschluss der Granulozytopoese, welche etwa 10-14 Tage in Anspruch nimmt

(Borregaard, 2010; Thomas, 2008), verlassen sie das Knochenmark und zirkulieren für einige Stunden im Blut, bis sie rekrutiert werden und ins Gewebe einwandern (Borregaard, 2010).

Das Zytoplasma der Neutrophilen enthält primäre, sekundäre und tertiäre Granula (Borregaard, 2010; Dale et al., 2008; Segal, 2005). Die primären Granula, auch als azurophile Granula bezeichnet, enthalten zum größten Teil Proteine und Peptide zur Abtötung und Verdauung von Mikroorganismen. Neben Myeloperoxidase (MPO) und Elastase enthalten sie Proteinase 3, Defensine und Lysozym. Die sekundären beziehungsweise spezifischen Granula enthalten Lysozym, Laktoferrin, Transcobalamin II, Proteinasen (unter anderem Gelatinasen, Kollagenasen, Elastasen, Histaminase) sowie verschiedene Oberflächenrezeptorproteine. Sekundäre Granula werden primär in Phagolysosomen und mitunter auch in die extrazelluläre Umgebung entlassen. Die tertiären Granula werden bei direkter Stimulation der Neutrophilen freigesetzt. Sie enthalten unter anderem Gelatinase sowie verschiedene Oberflächenrezeptorproteine (Segal, 2005). Das endoplasmatische Retikulum der Neutrophilen ist schwach ausgebildet und es finden sich wenige Mitochondrien im Zytoplasma. Um ihre Aufgabe im Gewebe erfüllen zu können, müssen die PMN den zirkulierenden Blutstrom verlassen und zum Ort der Entzündung vordringen. Bei diesem Vorgang spielen interzelluläre Adhäsionsmoleküle wie *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1) eine entscheidende Rolle. Die Expression von ICAM-1 auf der Oberflächenmembran von Endothelzellen wird durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α induziert, die unter anderem von aktivierten Gewebsmakrophagen, Epithelzellen und Fibroblasten produziert werden (Springer, 1990). ICAM-1 bindet an *Lymphocyte Function associated Antigen-1* (LFA-1; CD11a/CD18) und vermittelt damit die Adhäsion zwischen Endothelzelle und Leukozyt, die Voraussetzung für die Transmigration der Leukozyten ins Gewebe ist (Meyle, 1994; Springer, 1990). LFA-1 gehört zur $\beta 2$ Subfamilie der Leukozytenintegrine und steht in engem Zusammenhang mit zwei anderen Integrinen, MAC-1 (CD11b/CD18) und p150,95 (CD11c/CD18), welche die gleiche $\beta 2$ Untereinheit teilen (Springer, 1990). MAC-1 und p150,95 sind besonders wichtig für die Adhäsion myeloider Zellen an andere Zellen und zu Liganden, die bei der Aktivierung des Komplementsystems und der Gerinnungskaskade gebunden werden (Springer, 1990). Die Bedeutung dieser Leukozytenintegrine lässt sich besonders an einer Erkrankung veranschaulichen, bei der durch eine Mutation in der gemeinsamen $\beta 2$ Untereinheit die Adhäsion der Leukozyten gestört ist und als Leukozyten-Adhäsionsdefekt-Syndrom (LAD) bezeichnet wird. An LAD erkrankte Patienten leiden mitunter an lebensbedrohlichen, bak-

teriell oder pilzlich bedingten rezidivierenden Entzündungen und Blutgerinnungsstörungen (van de Vijver et al., 2012).

Bevor am Endothel adhärierende Granulozyten den Blutstrom verlassen und *via* Diapedese ins Gewebe einwandern, rollen sie zunächst an der Endothelwand entlang und stellen eine lockere Bindung mit dieser her. Damit unterteilt sich die Extravasation in die Schritte Aktivierung, Rollen, Adhäsion und Diapedese (Borregaard, 2010; Meyle, 1994). Die initiale Bindung zwischen den Granulozyten und den Endothelzellen kommt durch die Bindung von Selektinen auf den Endothelzellen und Sialyl-Lewis X auf der Oberfläche der Granulozyten zustande. L-Selektine, Oberflächenrezeptoren der Neutrophilen, sowie P- und E-Selektine, Oberflächenmoleküle der Endothelzellen, induzieren das Rollen der Zellen auf der Endotheloberfläche durch Bindung an Sialyl-Lewis-X der Neutrophilen beziehungsweise an Addressine der Endothelzellen. Es kommt zu einer lockeren Bindung zwischen Granulozyt und Endothelzelle. Die Bindung von CD31 (PECAM-1 = *Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule*) an den entsprechenden Rezeptor der Endothelzelle führt zur gesteigerten Expression sowie zur Aktivierung von Integrinrezeptoren und es kommt zur Adhäsion der Granulozyten an der Endotheloberfläche (Borregaard, 2010; Meyle, 1994). Auf Membranen von Granulozyten werden drei verschiedene Klassen von Integrinrezeptoren exprimiert, welche die Bindung zu den Endothelzellen vermitteln: CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (MAC-1) und CD11c/CD18 (p150,95) (Borregaard, 2010; Dennison & Van Dyke, 1997; Elghetany & Lacombe, 2004; Meyle, 1994; Springer, 1990). Durch diese Bindungen aktiviert und durch Chemotaktika angelockt, setzen die Granulozyten ihren Weg zwischen den Endothelzellen und durch das Gewebe hin zum Ursprung des entzündlichen Reizes fort (Abbildung 5). Das Hindurchgleiten der Zellen durch das Endothel wird als Diapedese bezeichnet. Im Gewebe angekommen bewegen sich Abwehrzellen dem chemischen Gradienten folgend auf den Infektionsherd zu, was zu einer charakteristisch asymmetrischen Formveränderung der Zellen führt. Der vordere Teil des Granulozyts bildet das Pseudopodium aus, das durch seine Aktinfilamente und regulatorischen Proteine essenziell für die Lokomotion der Zelle ist. Das Ende der Zelle hingegen nimmt die Form eines schwanzähnlichen Ausläufers an (Dale et al., 2008; Zigmond, 1989).

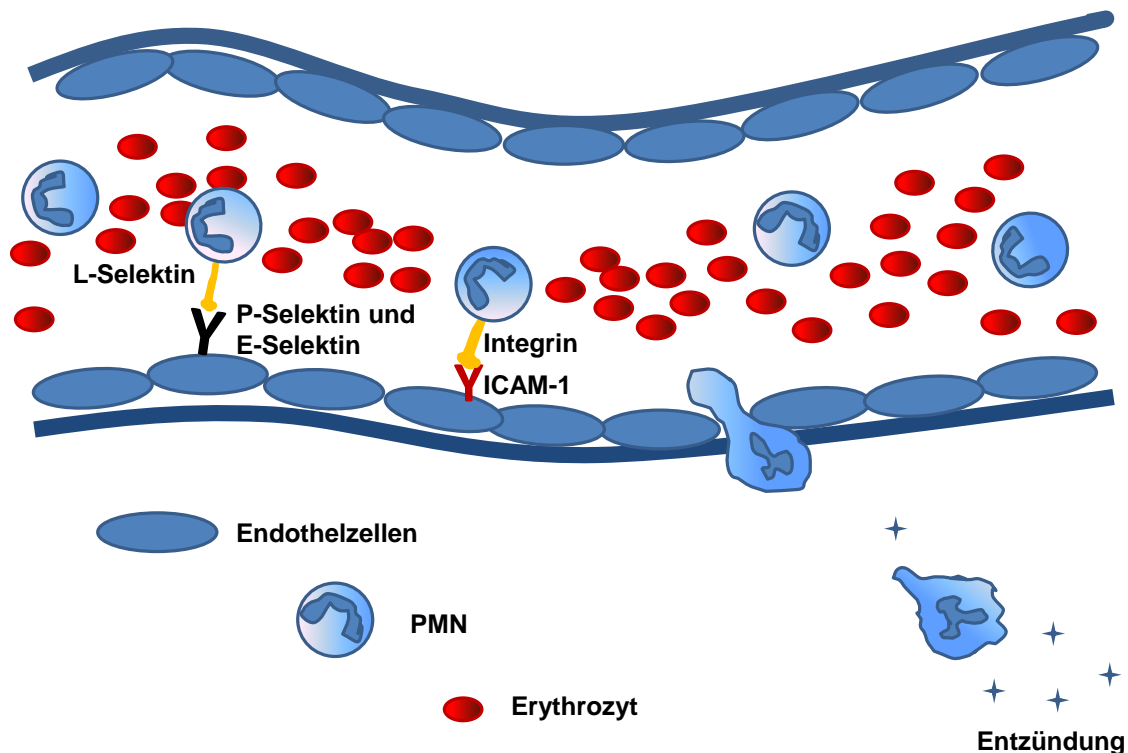


Abbildung 5: Schematische Darstellung der transepithelialen Migration neutrophiler Granulozyten. Selektine induzieren das Rollen der Zellen entlang des Endothels. Durch Aktivierung der Integrine kommt es zur festen Bindung an die endotheliale Oberfläche. Die Zelle kann via Diapedese ins Gewebe einwandern und dort durch Chemotaxis geleitet an den Ort der Entzündung gelangen (angelehnt an Borregaard, 2010).

Bei den chemotaktisch wirksamen Substanzen handelt es sich zumeist um Substanzen wie IL-8, LTB₄ und andere Zytokine sowie um C3b, C5a und bakterielle Metaboliten (N-formyl-Peptide). Granulozyten können über die Länge ihres Zellkörpers Konzentrationsveränderungen des Chemotaktikums von 2 % wahrnehmen und ihre Bewegung dementsprechend ausrichten (Zigmond, 1989). Am Ort der Entzündung erkennen sie über ihre Oberflächenrezeptoren mit C3b, C3bi oder IgG opsonierte Mikroorganismen, binden diese Moleküle und phagozytieren die Mikroorganismen indem sie diese umfließen und in sich aufnehmen (Dale et al., 2008; Dennison & Van Dyke, 1997; Segal, 2005). Es entsteht ein Phagosom in dem die Mikroorganismen nach Fusion mit Lysosomen durch proteolytische Enzyme und reaktive Sauerstoffverbindungen abgetötet werden (Segal, 2005). Gelingt die Phagozytose nicht oder ist sie nur unvollständig möglich (zum Beispiel wenn das Antigen größer als der Granulozyt ist), kann es am Entzündungsort mitunter zur extrazellulären Freisetzung der Granula kommen (Weissmann, Zurier, & Hoffstein, 1972). Nach Aufnahme und Verdauung des phagozytierten Materials wird dieses nach extrazellulär sezerniert oder es kommt nach Apoptose beziehungsweise Nekrose des Granulozyten zu einer extrazellulären Freisetzung (Borregaard, 2010).

2.5.1 CD11b/CD18-Komplex (MAC-1, CR3)

Das CD11b/CD18-Glykoprotein (Komplement-Rezeptor 3 = CR3; Makrophagen Antigen 1 = MAC-1) wird auf PMN, Monozyten, Makrophagen, Natürlichen Killerzellen (NK) und einer Subpopulation CD5⁺ B-Zellen und CD8⁺ T-Zellen exprimiert (Dennison & Van Dyke, 1997; Ross & Vetvicka, 1993). Der CD11b/CD18-Komplex gehört in die Gruppe der Leukozytenintegrine und ist Mitglied der gleichen Integrinmolekülunterfamilie wie CD11a/CD18 (LFA-1) und CD11c/CD18 (p150,95). Die Mitglieder dieser Unterfamilie sind nicht kovalent aneinander gebundene α/β Heterodimere mit der gleichen β -Einheit (Van Dyke, T. E. & Hoop, G. A. 1990). Bei der CD11b-Untereinheit handelt es sich um ein Typ1-Transmembranprotein von 165 kDa und bei der CD18 Untereinheit um eine β -Kette von 95 kDa (Ross & Vetvicka, 1993; Van Dyke & Hoop, 1990). Der Rezeptor spielt als Ligand bei der Adhäsion PMN an ICAM-1, welches von aktivierten Endothel- und Epithelzellen exprimiert wird, eine wichtige Rolle (Diamond et al., 1990; Smith, Marlin, Rothlein, Toman, & Anderson, 1989). Des Weiteren ist CD11b/CD18 Rezeptor für C3bi opsonierte Partikel und kann nach Aktivierung der PKC die Phagozytose dieser Antigene induzieren (Ross & Lambris, 1982; Ross & Vetvicka, 1993). Nach Ligandenbindung von L-Selektin kommt es zur Koaggregation von PMN (Simon, Chambers, Butcher, & Sklar, 1992). Weitere Liganden des Rezeptors sind Fibrinogen (Wright et al., 1988) und Faktor X der Gerinnungskaskade (Altieri & Edgington, 1988). Die chemotaktische Stimulierung von PMN mit fMLF und anderen Zytokinen führt zu einer Translation von CD11b/CD18-Rezeptorkomplexen aus intrazellulären Speicherpoolen an die Zelloberfläche (Hughes, Hollers, Crockett-Torabi, & Smith, 1992). Die Translation der intrazellulären Speicherpoole ist dabei abhängig von intra- und extrazellulärem Ca^{2+} (Berger et al., 1985).

2.5.2 CD15 (Sialyl LewisX)

Beim CD15 Antigen handelt es sich strukturell um eine Trisaccharidsequenz. Im Blut wird es auf Glykolipid- und Glykoproteinstrukturen von PMN, eosinophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert. Die Sialylierung von Lewis-x (Le^x) zu Sialyl- Le^x wird durch 2,3-Sialytransferasen katalysiert. Sialyl- Le^x dient als Ligand für alle drei Selektine (L-, E- und P-Selektine). Durch die Bindung des Rezeptors an E- und P-Selektine des Endothels werden die Neutrophilen abgebremst und es kommt zum Rollen entlang des Endothels (Bhatia, King, & Hammer, 2003; Sperandio, 2006).

2.6 Chemotaxisuntersuchungen

Chemotaxis ist die gerichtete Zellbewegung entlang eines chemischen Gradienten (Zigmond, 1989). Die Bewegung entlang des Gradienten zum Ort der höheren Konzentration wird als positive Chemotaxis bezeichnet, die Bewegung in die andere Richtung als negative Chemotaxis. Der chemotaktisch wirksame Stoff wird entsprechend als *chemoattractant* (positive Chemotaxis) oder *chemorepellent* (negative Chemotaxis) bezeichnet. Im Folgenden werden Methoden zur Untersuchung positiver Chemotaxis humaner Zellen beschrieben, wie sie sich bei Entzündungen abspielt.

1955 untersuchten REBUCK ET AL. mit der von ihm entwickelten Hautfenster-Technik Chemotaxis *in vivo*. Er untersuchte die lokale leukozytäre Migration, indem er künstliche Läsionen auf der Haut seiner Probanden herstellte, auf diese eine entzündungsauslösende Substanz gab und sie dann mit einem Glasplättchen abdeckte. Nach einer bestimmten Zeit entnahm er dieses Glasplättchen wieder um das daran haftende Exsudat zu untersuchen und die Zellen zu zählen (Rebuck & Crowley, 1955). 1962 wurde durch BOYDEN eine Chemotaxiskammer (Boyden-Kammer) konzipiert, die als Grundlage für viele weitere Untersuchungen diente und bis heute bei *in vitro* Untersuchungen eingesetzt wird. Durch einen Filter wird die Boyden-Kammer in einen oberen und unteren Bereich geteilt. In die untere Kammer wird ein chemotaktisch wirksamer Lockstoff gegeben und in die obere Kammer die Suspension mit der zu untersuchenden Zellpopulation (Abbildung 6). Die durch das Chemotaktikum angelockten Zellen wandern in den Filter ein. Eine definierte Porengröße ermöglicht Wanderung der Zellen nach Reizung, jedoch kein passives Hindurchgleiten. Die Entnahme des Filters erfolgt nach einer festgelegten Inkubationszeit. Danach werden die an der Unterseite des Filters befindlichen Zellen fixiert und gefärbt. Die Auswertung erfolgt lichtmikroskopisch durch Auszählen dieser Zellen (Boyden, 1962). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass Zellen, die innerhalb der Inkubationszeit den gesamten Filter durchwandert haben, nicht mehr gezählt werden und Veränderungen der Zellmorphologie sowie die Richtung der Zellbewegung und deren Geschwindigkeit nicht direkt beobachtet werden können.

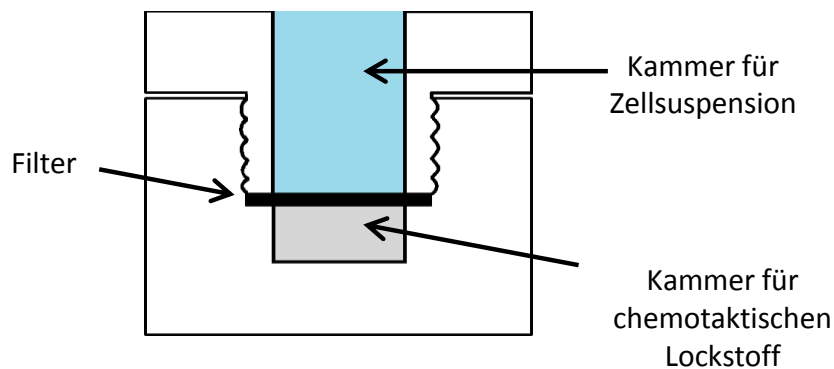


Abbildung 6: Boyden-Kammer.

Das Prinzip der Boyden-Kammer wurde unter anderem von ZIGMOND modifiziert (Zigmond & Hirsch, 1973) und führte zur Entwicklung der Zigmond-Kammer. Bei diesem Chemotaxis-Assay sind die Kammer mit dem Zellmedium und die Kammer mit dem chemotaktischen Lockstoff horizontal nebeneinander angeordnet und über einen schmalen Spalt ($\sim 10 \mu\text{m}$) verbunden, der sich zwischen der Brücke der Kammern und einem darüber liegenden Deckglas bildet. Dieses Verfahren ermöglicht es die Zellen direkt unter dem Mikroskop zu beobachten, morphologische Formveränderungen zu erkennen und die Richtung der Zellbewegung zu bestimmen (Zigmond, 1977). Bei der klinischen Anwendung dieser Kammersysteme besteht das Problem, dass zwischen einem Testversagen (falsch-negatives Ergebnis) und einem echten funktionalen Chemotaxisdefekte (richtig-negativ) nicht unterschieden werden kann. Um dies zu beheben entwickelte MEYLE eine neue Methode bei der mittels Mehrfachansätzen in modifizierten Boyden-Kammern und Vergleich der einzelnen Regressionskoeffizienten falsch-negative Ergebnisse innerhalb der Zellpopulation eines Individuums identifiziert werden können (Meyle & Axmann-Krcmar, 1999). 1975 etablierten NELSON ET AL. die Chemotaxis durch Agarose-Gel Methode im Humanbereich. Bei dieser Methode zur Untersuchung der chemotaktischen Aktivität wird in einer Petrischale befindliches Agarose-Gel benutzt, in das drei Vertiefungen gestanzt werden. In die äußeren Vertiefungen wird das Chemotaktikum beziehungsweise die Kontrollsubstanz gegeben und in die zentrale Vertiefung die Suspension mit den zu untersuchenden Zellen. Nach einer vorgegebenen Inkubationszeit erfolgt die Entfernung des Agarose-Gels durch Austrocknung. Die Zellen befinden sich danach am Boden der Petrischale, wo sie gefärbt und ausgezählt werden können. Mit dieser Methode kann zusätzlich die Messung der spontanen Migration (*random migration*), die Chemokinese (ungerichtete Zellbewegung) sowie die Hemmung der Migration geprüft werden (Nelson, Quie, & Simmons, 1975).

Ein anderes Konzept zur Untersuchung der *in vivo* Chemotaxis am Menschen wurde von GOLUB ET AL. für die Mundhöhle entwickelt. Durch Einbringen eines inflammatorischen Reizes (chemotaktisch wirksame Caseinlösung) in den *Sulcus gingivae* lösten sie die leukozytäre Wanderung in diesen aus. Jeweils vor und 15, 20, 25, 30, 35, 40 und 45 Minuten nach Reizapplikation wurden Proben entnommen. Die Probengewinnung erfolgte nach der 1976 von SKAPSKI UND LEHNER entwickelte Methode, bei der durch mehrfaches aspirieren von 10 µl phoshatgepufferter Kochsalzlösung mittels Mikrospritze im Sulcus beziehungsweise in der parodontalen Tasche, SF entnommen wird. Im direkten Anschluss wurden die Leukozyten ausgezählt. Die Höchstwerte der leukozytären Einwanderung lagen bei 25 Minuten. In Analogie zeigte die stimulierte Messung der SFFR Maxima bei 35 Minuten. Mit diesen Tests sollten diagnostische Verfahren zur Identifikation von Patienten mit Leukozytendefekten entwickelt werden (Golub et al., 1981).

Basierend auf dieser Methode untersuchte die gleiche Arbeitsgruppe 1982 die Leukozyten-Antwort in der Sulcusflüssigkeit von diabetischen Ratten (Alloxan-induzierter DM) und gesunden Tieren (n = 14). Nachdem die Tiere für 4 (n = 4), 14 (n = 8) und 20 (n = 5) Tage diabetisch waren, wurde ihnen unter Narkose die Gingiva um die oberen Inzisiven chirurgisch exzidiert und nach der beschriebenen Methode Proben entnommen. Es zeigte sich bei allen Ratten, die unter einem unkontrollierten Diabetes litten, eine deutlich niedrigere Anzahl der zum Zeitpunkt der maximalen leukozytären Antwort eingewanderten Zellen, als bei den Kontrolltieren. Bei den unkontrolliert diabetischen Tieren äußerte sich dies in einem bis zu 83 % niedrigeren Maximum der chemotaktischen Antwort, wohingegen bei Tieren, die mit Insulin behandelt wurden, das Maximum nur um 34 % niedriger war. Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe der Agarose-Gel Methode und peritonealen Neutrophilen derselben Ratten bestätigt und als durch Diabetes bedingter Chemotaxisdefekt interpretiert (Golub et al., 1982). Es folgte die weitere Anwendung dieser Technik zur Testung der lokalen Chemotaxis im *Sulcus gingivae* bei Patienten mit chronischer Parodontitis, aggressiver Parodontitis (damals lokalisierte juvenile Parodontitis; LJP) sowie bei einem Patienten mit insulinabhängigem DM und chronischer Parodontitis. Im Vergleich zu gesunden Probanden wanderten bei allen Patienten mit einer oralen Erkrankung mehr Zellen in die parodontale Tasche beziehungsweise den Sulcus ein. Bei den Patienten mit juveniler Parodontitis und dem Patienten mit Diabetes konnte zudem ein atypischer Verlauf der leukozytären Einwanderungskinetik mit zwei Maxima beobachtet werden (Iacono et al., 1985).

Eine weitere Tierstudie zu diesem Thema führten OZSOY ET AL. (2004) durch. Sie untersuchten Gingiva-Biopsien von diabetischen Ratten (Alloxan-induzierter DM) mit

dem Elektronenmikroskop auf ultrastrukturelle Veränderungen der sulculären PMN nach chemotaktischer Aktivierung durch Casein oder fMLF. Eine erste Probenentnahme erfolgte 15 Minuten nach Reizapplikation, weitere in 5-minütigen Abständen mit einer letzten Messung nach 45 Minuten. 30 Minuten nach Applikation des Caseins und 35 Minuten nach Applikation des fMLF war die chemotaktische Antwort am stärksten. In den Proben, die nach 40 Minuten entnommen wurden, befanden sich PMN mit pyknotischen Zellkernen. Nach 45 Minuten waren PMN mit einer verminderten Anzahl von Granula präsent. Die strukturelle Deformation der Zellen stieg in dieser Studie mit dem Schweregrad des Diabetes.

Weitere zu diesem Themenkomplex durchgeführte Studien mit PMN aus peripherem Blut zeigten teilweise diametrale Ergebnisse. So untersuchten DELAMAIRE ET AL. 1997 Adhärenz, Chemotaxis, Phagozytose und bakterizide Funktion an PMN von 61 Diabetikern, wobei 40 Personen dieser Gruppe an DM Typ 2 und 21 an DM Typ 1 erkrankt waren, und verglichen diese Daten mit denen von Gesunden. Die Chemotaxis wurde mit Hilfe der Chemotaxis durch Agarose-Gel Methode und den chemotaktisch wirksamen Substanzen fMLF und Komplementproteinen untersucht, die Adhärenz mit Hilfe der Expression von CD11a, CD11b und CD11c, die Phagozytose mit Hilfe von opsonierten Latexpartikeln und die bakterizide Funktion über die Chemilumineszenz reaktiver Sauerstoffverbindungen. Es zeigte sich, dass die PMN-Chemotaxis bei den Patienten niedriger war als bei den Kontrollen ($p < 0,001$) und mit spontaner Adhärenz sowie einer erhöhten Expression der Adhäsionsmoleküle CD11b und CD11c assoziiert war. Eine Korrelation mit dem Alter, der Dauer der Erkrankung und des HbA1c-Wertes konnte nicht festgestellt werden (Delamaire et al., 1997). Das Ergebnis bezüglich der chemotaktischen PMN-Aktivität wurde ein Jahr später durch eine weitere Studie bestätigt. In dieser Studie wurden die aus Blut isolierten PMN von 41 Typ 1 Diabetiker sowie die PMN einer gesunden Kontrollgruppe unter Verwendung einer modifizierten Boyden-Kammer und fMLF als Chemotaktikum untersucht. Eine Korrelation des Glukose-Metabolismus, ausgedrückt durch den HbA1c-Wert, mit der Chemotaxis konnte ebenfalls nicht festgestellt werden (Gustke et al., 1998).

Zu einem völlig anderen Ergebnis kamen VALERIUS ET AL., die mit einer modifizierten Boyden-Kammer insgesamt 36 gut und schlecht eingestellte insulinabhängige sowie insulinunabhängige Typ 1 und 2 Diabetiker untersuchten. Als Chemotaktikum wurde Casein und in einigen Experimenten auch *Escherichia coli* LPS benutzt. Es konnten keine Unterschiede in der chemotaktischen Aktivität der PMN zwischen den untersuchten Gruppen gefunden werden (Valerius et al., 1982). Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen auch NAGHIBI ET AL. nachdem sie die PMN-Chemotaxis von 26 Patienten,

10 mit DM Typ 1 und 16 mit DM Typ 2, mit der Agarose-Gel Methode und fMLF untersucht hatten (Naghibi et al., 1987). Auch WIERUSZ-WYSOCKA ET AL. konnten unter Anwendung der gleichen Methode keinen Unterschied in der Chemotaxis isolierter Granulozyten von Diabetikern Typ 1 (n = 50) zu Gesunden (n = 50) auf fMLF und *Escherichia coli* LPS feststellen, wohingegen die Chemotaxis auf Zymosan-aktiviertes oder mit Cellophan inkubiertes Plasma bei den Diabetikern beeinträchtigt war (Wierusz-Wysocka et al., 1987).

Tabelle 4: Zusammenfassung der Daten zur Chemotaxis bei Diabetikern.

Autor	Jahr	Methode	PMN	Chemotaktikum	Art	DM	Ergebnis
Golub, Nicoll et al.	1982	Skapski und Lehner Agarose-Gel	PMN _{SF} PMN _{PER}	Casein und fMLF	A	Alloxan-induziert	--
Valerius, Eff et al.	1982	Modifizierte Boyden-Kammer	PMN _{PB}	Casein und <i>E. coli</i> LPS	H	1 und 2	+/-
Iacono, Singh et al.	1985	Skapski und Lehner	PMN _{SF}	Casein	A H	Alloxan-induziert 1	-- atypische PMN-Einwanderungskinetik
Naghibi, Smith et al.	1987	Agarose-Gel	PMN _{PB}	fMLF	H	1 und 2	+/-
Wierusz-Wysocka et al.	1987	Agarose-Gel	PMN _{PB}	Casein und <i>E. coli</i> LPS Zymosan-aktiviertes Plasma	H	1	+/- --
Dela-maire et al.	1997	Agarose-Gel Durchflusszytometrie	PMN _{PB}	fMLF	H	1	-- Expression CD11a, b ↑
Gustke, Stein et al.	1998	Modifizierte Boyden-Kammer	PMN _{PB}	fMLF	H	1	--

DM: Typ des Diabetes mellitus; -- : Verminderte Chemotaxis bei Diabetikern; +/-: Kein Unterschied; PMN_{PB}: Neutrophile Granulozyten aus peripherem Blut; PMN_{SF}: Neutrophile Granulozyten aus Sulcusflüssigkeit; PMN_{PER}: Neutrophile Granulozyten aus dem Peritonealraum; fMLF: N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin; A: Tierexperiment; H: Humanstudie.

3. Ziele der Studie

Ziel der Studie war es, die experimentelle chemotaktische Reaktion von PMN im *Sulcus gingivae* von Diabetikern mit chronischer Parodontitis zu analysieren. Die Arbeitshypothesen wurden basierend auf der zu diesem Themenkomplex vorhandenen Evidenz formuliert. Die Arbeit soll Aufschluss über die Frage geben:

Beeinflusst Diabetes mellitus die lokale Chemotaxis von PMN im Parodont?

Arbeitshypothesen

H1 = Ein standardisierter inflammatorischer Reiz (Casein) löst gegenüber einer Negativkontrolle eine gesteigerte PMN-Einwanderung in den Sulcus gingivae aus.

H2 = Die Anzahl der nach Setzen eines inflammatorischen Reizes in den Sulcus gingivae eingewanderten PMN ist bei Diabetikern mit Parodontitis im Vergleich zu Patienten mit Parodontitis und Gesunden vermindert.

H3 = Die Expression des leukozytären Oberflächenrezeptors CD11b ist auf sulculären PMN von Diabetikern mit Parodontitis im Vergleich zu Patienten mit Parodontitis und Gesunden nach Stimulation mit einem inflammatorischen Reiz erhöht.

H4 = Die Expression des leukozytären Oberflächenrezeptors CD15 ist auf sulculären PMN von Diabetikern mit Parodontitis im Vergleich zu Patienten mit Parodontitis und Gesunden nach Stimulation mit einem inflammatorischen Reiz erhöht.

4. Materialien und Methoden

4.1 Studiendesign

Es handelte sich um eine prospektive, dreiarmlige kontrollierte Studie mit deskriptiver Auswertungscharakteristik.

4.2 Votum der Ethikkommission

Die Studienpopulation rekrutierte sich aus Patienten und Probanden der Studie „Zytosolische Signalübertragung humaner polymorphkerniger Granulozyten und zelluläre Effektorfunktionen bei Patienten mit Diabetes mellitus und chronischer Parodontitis“ (Ethikkommission Antragsnummer: 175/07). Für die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der oben genannten Studie bei der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität ein Amendment beantragt, das ein positives Votum erhielt (Ethikkommission Antragsnummer: 175/07 Amendment I).

4.3 Selektion der Studienpopulation

Basierend auf der bisherigen Literatur zum bearbeiteten Themenkomplex und Beratung in der Abteilung für medizinische Statistik (Dr. Bödeker) wurde festgelegt, dass pro Diagnosegruppe 10 Personen an der Studie teilnehmen sollten. Die erste Patientengruppe bestand aus 10 Typ 2 Diabetikern mit chronischer Parodontitis (DM2+P) und die zweite aus 10 Personen mit chronischer Parodontitis (P). Als Kontrollgruppe (C) dienten 10 systemisch und parodontal Gesunde. Im Folgenden werden die allgemeinen und lokalen Ein- und Ausschlusskriterien der Studie beschrieben.

Allgemeine Einschlusskriterien:

- Alter zwischen 18 und 80 Jahre
- Schriftliches Einverständnis nach Aufklärung
- Restzahnbestand ≥ 12 Zähne
- Gute Compliance
- Nichtraucher
- DM2+P: Diagnose Diabetes mellitus Typ 2 und chronische Parodontitis
- P: Diagnose chronische Parodontitis

Allgemeine Ausschlusskriterien:

- Schwangerschaft
- Zigaretten- oder sonstiger Nikotinkonsum
- Allergien, insbesondere gegen Milchprodukte und Casein
- Chronische Allgemeinerkrankungen, die in der Mundhöhle zu Veränderungen führen
- Restzahnbestand < 12 Zähne
- Akute Erkrankungen, wie grippale oder fiebrige Infekte
- Einnahme von Antibiotika, Psychopharmaka, Antihistaminika oder Immunsuppressiva innerhalb der letzten 6 Monate
- DM2+P: Diabetische Folgeerkrankungen, wie Retinopathien, Nephropathien oder periphere Neuropathien

Aus Gründen der Praktikabilität (Speichelzutritt oder Ähnliches) und des Patientenkomforts bei der Probenentnahme erfolgte die Probengewinnung ausschließlich an Oberkieferzähnen.

Lokale Einschlussbedingungen:

- Parodontien des Test- und Kontrollzahnes: Sondierungstiefe ≤ 3 mm
- Zähne, an denen SF zur Volumenbestimmung entnommen wurde: Sondierungstiefe ≤ 4 mm
- Am Tag der Probenentnahme (Tag 0): Papillenblutungsindex = 0 an allen in die Studie einbezogenen Zähnen, das heißt völlige klinische Entzündungsfreiheit

Lokale Ausschlusskriterien:

- Zähne mit gingivalen und subgingivalen Füllungs- oder Kronenrändern
- Parodontien des Test- und Kontrollzahnes: Sondierungstiefe > 3 mm
- Zähne, an denen SF zur Volumenbestimmung entnommen wurde: Sondierungstiefe > 4 mm
- Am Tag der Probenentnahme (Tag 0): Papillenblutungsindex $\neq 0$ an einem oder mehreren in die Studie einbezogenen Zähnen

4.4 Aufklärung der Studienteilnehmer

Alle Probanden und Patienten wurden über die Inhalte der Untersuchung, geplante Behandlungen, mögliche Risiken und Nebenwirkungen aufgeklärt. Konform mit den

Vorgaben der Ethikkommission erfolgte die Aufklärung im persönlichen Gespräch und unter Verwendung eines Informationsblatts, welches den Teilnehmern in Kopie ausgehändigt wurde. Jeder Studienteilnehmer legte seine Einwilligung schriftlich nieder und es wurde ihm mitgeteilt, dass dieses Einverständnis jederzeit widerrufbar sei und er aus der Studie ausscheiden könne.

Es wurde darauf hingewiesen, dass nach Abschluss der Mundhygienephase am Tag der Probenentnahme keine Zahnseide angewendet werden dürfe, um eine mechanische Irritation der Gingiva zu vermeiden.

4.5 Methodik und Vorversuche

Um die Methodik der SF-Entnahme zu etablieren, wurde bei 8 Personen jeder Gruppe die PMN-Einwanderungskinetik in den *Sulcus gingivae* nach chemotaktischer Reizapplikation untersucht.

4.5.1 Methode nach MEYLE

Die Entnahme der SF wurde modifiziert nach der von MEYLE (1986) etablierten Methode durchgeführt. Die Probenentnahme erfolgte bei den Vorversuchen an den Zähnen 12 und 22. Waren diese Zähne nicht vorhanden, wurde der jeweils nächste mesial der Lücke gelegene Zahn zur Probenentnahme herangezogen. Die Zuordnung von Test- und Kontrollzahn wurde für jeden Studienteilnehmer per Losung im Vorhinein festgelegt (Urnenmodell). Nach Trockenlegung des Oberkiefers mittels Watterollen und Entfernung möglicher supragingivaler weicher Beläge mit dem Scaler, wurden die Zahnzwischenräume mit sanften Luftpüsterstößen jeweils 2 Sekunden von mesio- und distobuccal getrocknet. Der Zutritt von Speichel wurde während des gesamten sich anschließenden Probengewinnungszeitraums unterbunden. Die zwei zur Probenentnahme herangezogenen Zähne wurden mesial mit einer Markierung versehen um die Proben immer an derselben Stelle des Sulcus entnehmen zu können. Zunächst erfolgte an allen Zähnen eine Baselinewaschung des Sulcus (BL) um an allen Entnahmestellen die gleichen Ausgangsbedingungen herzustellen. Dazu wurde die abgerundete Kanüle einer 5 ml Luer-Lock-Einmalspritze entlang der am Zahn befindlichen Markierung 1 mm in den betreffenden Sulcus eingebracht und dieser mit 1 ml phosphatgepufferter isotonischer Kochsalzlösung ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} ($\text{PBS}^{-/-}$) innerhalb von 15 Sekunden ausgespült (Abbildung 7).

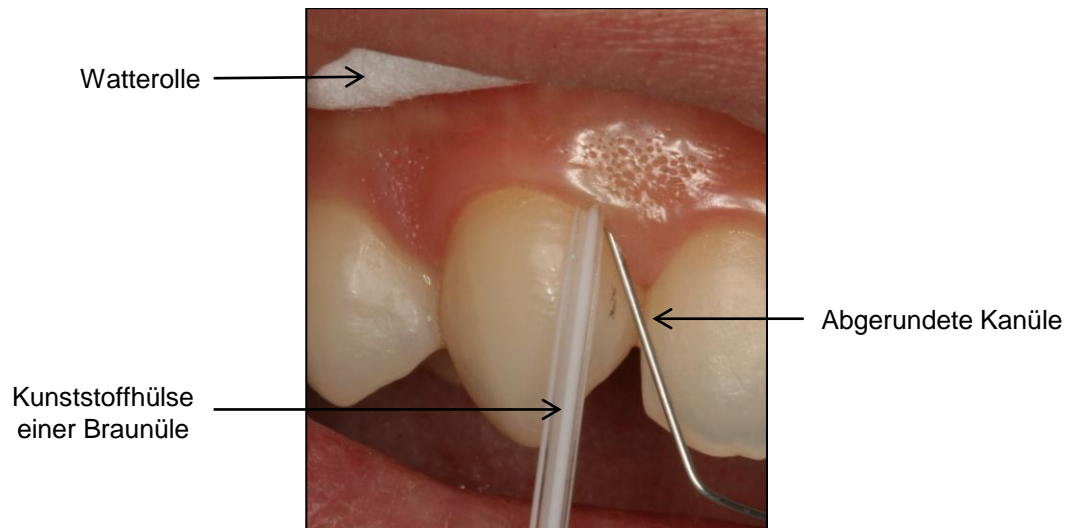


Abbildung 7: Entnahme von Sulcusflüssigkeit.

Die aus dem Sulcus hervortretende Flüssigkeit wurde mit der Kunststoffhülse einer Braunüle über einen 20 cm langen Infusionsschlauch in ein auf Eis gelagertes 15 ml Falcon abgesaugt. Das Falcon war über einen Schlauch und ein Dreiwegeventil an die Vakuumversorgung der Einheit angeschlossen, welche einen Unterdruck von etwa 0,1 bar an der Spitze der Ansaugkanüle erzeugte (Abbildung 8).

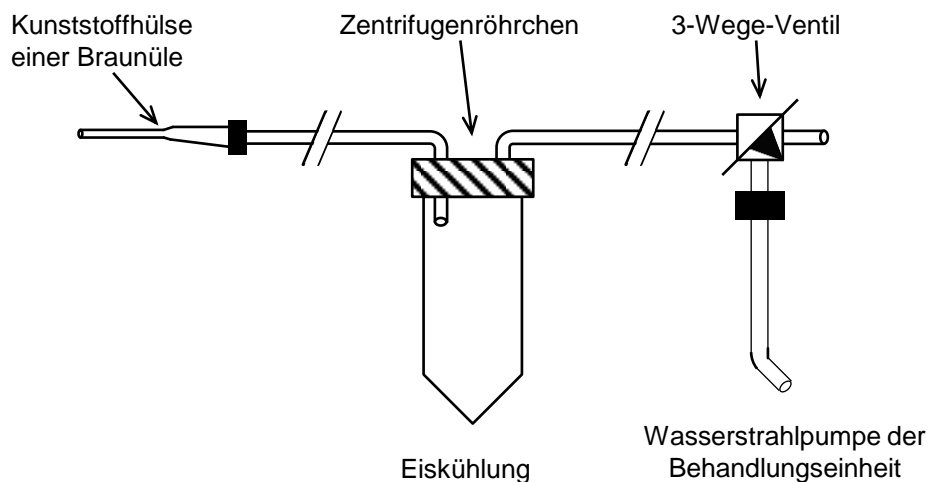


Abbildung 8: Schematischer Aufbau des SF-Absaugsystems (Meyle, 1986).

Um verbliebene Zellen aus dem Absaugsystem in das Röhrchen zu schwemmen, wurde das Probensammelsystem nach den Waschungen jeweils mit 2 ml PBS^(-/-) nachgespült. Vor und nach jeder Probenentnahme wurde das Schlauchsystem mit 20 ml 70 %igem Ethanol und anschließend zweimal mit 20 ml steriler Kochsalzlösung durchgespült um etwaige Plastikmonomere oder sonstige Produktionsrückstände zu entfernen, die die zelluläre Aggregation begünstigen könnten.

Nach der Baselinewaschung wurden alle betroffenen Zähne wiederholt mit 2 Sekunden andauernden sanften Luftpüsterstößen getrocknet, um eine mögliche Verdünnung der Testsubstanzen zu verhindern. In den Sulcus des Testzahnes wurde mittels Pipette 2 µl einer Caseinlösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml als inflammatorischer Standardreiz appliziert (Abbildung 9). In den Sulcus des Kontrollzahnes wurde als Placebo die gleiche Menge der Trägersubstanz (PBS mit Ca^{2+} ohne Mg^{2+}) ohne Casein appliziert.

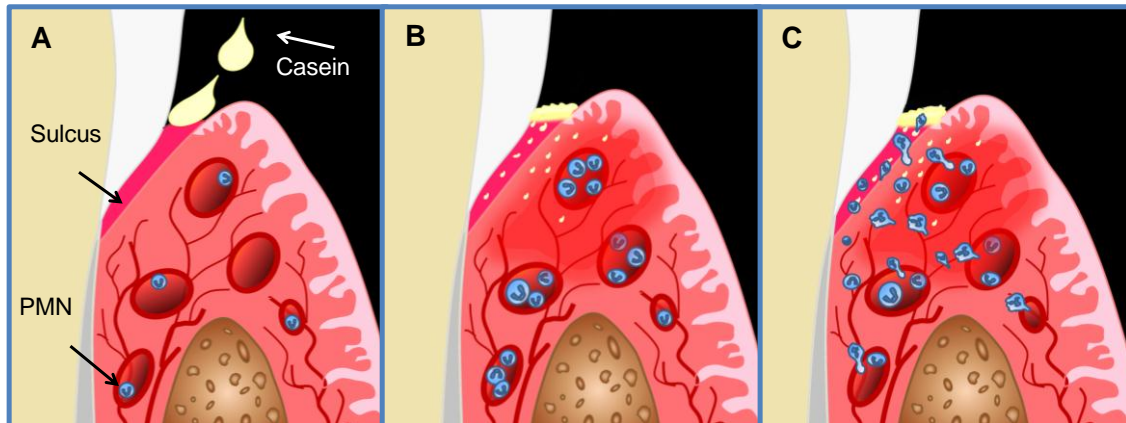


Abbildung 9: Lokale experimentelle Entzündungsreaktion durch Casein. **A:** Das Casein wird in den *Sulcus gingivae* pipettiert. **B:** Das Casein verteilt sich im umliegenden Gewebe und induziert eine lokale Entzündungsreaktion. Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) werden chemotaktisch aktiviert und rollen am Endothel entlang. **C:** Die PMN verlassen die Kapillaren *via* Diapedese und wandern durch das Gewebe in den *Sulcus gingivae* ein.

Weitere Probenentnahmen erfolgten 15, 25, 35 und 45 Minuten nach Reiz- beziehungsweise Placeboapplikation. Die Falcons mit den gewonnen Proben wurden direkt nach jeder SF-Entnahme verschraubt und weiterhin auf Eis gelagert. Alle Flüssigkeiten, die in Kontakt mit der Gingiva kamen, wurden zuvor in einem Wärmebecken auf 37°C temperiert, um einen möglichen Einfluss der Temperatur auf das Gewebe auszuschließen.

4.5.2 PMN-Einwanderungskinetik

Die Anzahl der zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten BL, 15, 25, 35 und 45 Minuten eingewanderten PMN wurde im direkten Anschluss an die Probenentnahme durchflusszytometrisch bestimmt. Für jeden Studienteilnehmer ergab sich eine Gesamtmenge von 10 SF-Proben, wobei 5 Einzelproben aus dem mit Casein stimulierten Ansatz des Testzahnes und 5 aus dem nicht stimulierten Ansatz des Kontrollzahnes stammten. Die auf Eis gelagerten Falcons mit den Proben wurden unmittelbar nach Abschluss der Gewinnung bei 200 g ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$) und 4°C für 10 Minuten zentrifu-

giert. Da das Zellpellet sehr klein und mit bloßem Auge kaum sichtbar war, wurde der Überstand in 2 Schritten reduziert. Im ersten Schritt wurde der Inhalt bis zur 500 µl Markierung des Röhrchens entnommen und verworfen. Danach wurden weitere 350 µl abgenommen, das Restvolumen wurde auf 150 µl ergänzt und das Pellet resuspendiert. 100 µl jeder Probe wurden in die vorbereiteten Röhrchen zur durchflusszytometrischen Analyse pipettiert und jeweils das gleiche Volumen an CytoCount™ hinzugegeben. CytoCount™ ist eine für die durchflusszytometrische Anwendung bestimmte Suspension aus charakteristisch fluoreszierenden 5,2 µm großen Polystyrolkugeln (*counting beads*; CB) in einer wässrigen Lösung. Sie dienen als Referenzpopulation für die Auszählung einer zu untersuchenden Leukozytenpopulation. Die genaue Anzahl Kugeln pro µl ist vom Hersteller angegeben. Um ein möglichst gleiches Verhältnis von PMN zu CB zu erreichen, wurde die CytoCount™-Suspension vor Anwendung in einem Verhältnis von 1:10 mit PBS^(-/-) verdünnt. Das Absetzen der Zellen und CB auf dem Boden des Röhrchens wurde durch 3 Sekunden andauerndes Mischen mit einem Vortex-Mixer unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Messung verhindert. Bei jeder Messung wurden 5000 Ereignisse gezählt. Der Schwellenwert für ein Ereignis war auf $\geq 0,5$ µm festgelegt. Zur Analyse der Proben wurden die Ereignisse in einem Punkt-Diagramm mit Vorwärtsstreuung auf der x-Achse, als ein Maß für die Größe der Zellen beziehungsweise CB, gegen die Seitwärtsstreuung auf der y-Achse, als Maß für die Granularität, dargestellt. Die beiden interessierenden Populationen wurden dann eingegrenzt (*gating*) und die Anzahl der Ereignisse in den definierten Regionen bestimmt (Abbildung 10). Die Gates für die sulculären PMN (PMN_{sf}) entsprachen dabei denen der aus peripherem Blut isolierten PMN (PMN_{pB}) des gleichen Studienteilnehmers.

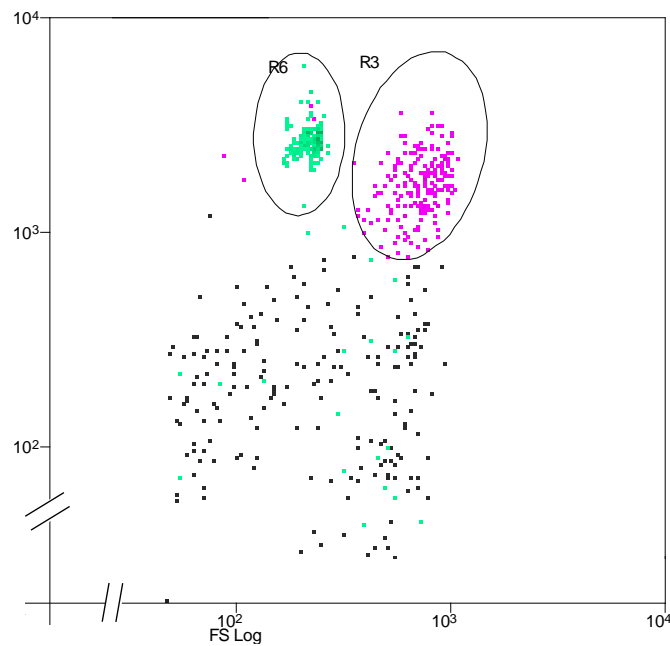


Abbildung 10: Durchflusszytometrische Darstellung einer SF-Probe. Vorwärtstreuung (FS) vs. seitliche Streuung (SS); Gate R6: CytoCounts™ (grün); Gate R3: PMNs (pink).

Die absolute Anzahl der bei einer Sulcuswaschung gewonnenen PMN_{SF} wurde mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$PMN_{ges.} = \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen (PMN)}}{\text{Anzahl gezählter CB-Kügelchen}} * CB_Konzentration * 150 \mu l$$

$PMN_{ges.}$ = Gesamtanzahl, der durch die Sulcuswaschung gewonnenen PMN_{SF}

CB = Cytocount Beats

Anzahl gezählter Zellen = Anzahl durchflusszytometrisch gezählter PMN_{SF}

Anzahl gezählter CB-Kügelchen = Anzahl der durchflusszytometrisch gezählten CB

$CB_Konzentration$ = Konzentration der CB in der hinzugegebenen Lösung (Anzahl/ μl)

4.6 Klinische Eingangsuntersuchung

Mittels Florida Probe® erfolgte eine vollständige parodontologische Untersuchung. Bei diesem System handelt es sich um eine PC-gestützte, druckkalibrierte Parodontalsonde mit einer Software zur Visualisierung, Ansage und Speicherung von erhobenen parodontalen Befunddaten. Die zu Messzwecken eingesetzte Version der Florida-Sonde arbeitet mit einem konstanten Sondendruck von 15 g und misst auf 0,2 mm genau. Im Befundschema (Anhang E) werden ganze Millimeterangaben angezeigt. So werden Werte > 0,5 mm oberhalb der ganzen Millimeterangabe aufgerundet, niedrigere Werte entsprechend abgerundet, wobei die jeweiligen Dezimalzahlen jedoch nach Export in MS-Excel für die spätere Auswertung zur Verfügung stehen. Für die Erhebung des Befundes wurde das europäische Befundschema gewählt. Es wurde an sechs Stellen pro Zahn (mesial, zentral und distal jeweils buccal und oral) untersucht.

Neben Sondierungstiefe (ST) wurde Sondierungsblutung (BOP) und differenziert dazu Pusaustritt, Gingivalrand (GR), klinisches Attachmentniveau (CAL) und Furkationsgrade (FK) dokumentiert (Abbildung 54, Anhang E). Die kariologische Untersuchung wurde auf einem getrenntem Formblatt dokumentiert (Abbildung 55, Anhang E).

4.7 Mundhygienephase

Nach der vollständigen Eingangsuntersuchung schlossen sich 3 weitere Mundhygieneuntersuchungen (Tag -14, Tag -7 und Tag 0) im Abstand von jeweils einer Woche an. Ziel dieses Vorgehens war die Optimierung der Mundhygiene der Studienteilnehmer und damit das Erreichen einer klinisch entzündungsfreien Gingiva. Es sollten gingival vergleichbare Ausgangsbedingungen bei Patienten und Probanden geschaffen werden, um den Einfluss von Gingivitis ausschließen zu können. Dazu wurden an den Tagen -14 und 0 die Mundhygieneindizes (Papillenblutungsindex und Plaqueindex) erfasst und die Ergebnisse dieser Untersuchungen in Dokumentationsbögen (Abbildung 59-60; Anhang E) festgehalten. An den Tagen -14 und -7 folgte eine professionelle Zahnreinigung (PZR) mit Entfernung aller supragingivalen und gingivalen Beläge, wie Plaque, Zahnstein und Verfärbungen. Anschließend wurde an allen Zähnen eine Schmelzpolitur durchgeführt. Die Studienteilnehmer erhielten eine Intensivmotivation und ihnen wurden individuelle Schwachstellen bei der täglichen Zahnreinigung aufgezeigt. Weiterhin erfolgte eine Auswahl von geeigneten Maßnahmen (Zahnputztechnik) und Hilfsmitteln (Zahnseide, Interdentalbürstchen u. Ä.) zur Verbesserung der individuellen Mundhygiene einschließlich der Demonstration dieser am Modell und individuell im Mund des Patienten beziehungsweise Probanden. Tabelle 5 gibt eine zusammenfassende Übersicht der Maßnahmen der Mundhygienephase. Die Probenentnahme erfolgte am Tag 0 vor der klinischen Untersuchung um eine mögliche Irritation des gingivalen Gewebes zu vermeiden.

Tabelle 5: Maßnahmen der Mundhygienephase.

Maßnahmen	Tag -14	Tag -7	Tag 0
Instruktion & Motivation	X	X	X
Mundhygieneindizes	X		X
PZR + Schmelzpolitur	X	X	
SFFR	X		X
SF-Entnahme			X
Blutentnahme			X

PZR: Professionelle Zahnreinigung; SFFR: Sulcusflüssigkeits-Fließrate; SF: Sulcusflüssigkeit.

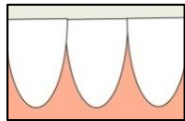
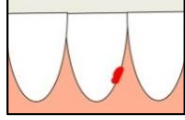
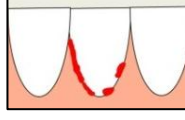
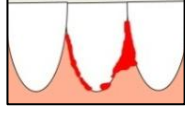
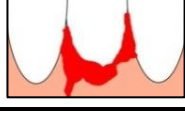
Modifizierter Papillenblutungsindex (PBI)

Jede interproximale Papille, mit Ausnahme der zwischen den mittleren Inzisiven, wurde nach dem Ausstreichen mit einer parodontalen Sonde bezüglich einer auftretenden Blutung beurteilt. Die Beurteilung erfolgte im 1. und 3. Quadranten oral und im 2. und 4. Quadranten vestibulär. Die Intensität der Blutung wurde basierend auf den Studien von SAXER UND MÜHLEMANN (1975) mit einem Indexwert von 0 bis 4 beurteilt (Tabelle 6).

Die Berechnung des Papillenblutungsindex eines Studienteilnehmers erfolgte nach der Formel:

$$PBI = \frac{\sum \text{Indexeinzelwerte}}{\sum \text{Interdentalräume}}$$

Tabelle 6: Papillenblutungsindex nach Saxer und Mühlemann (1975).

Grad	Kriterien	
0	Keine Blutung.	
1	Leichte, punktuelle Blutung.	
2	Moderate Blutung, Auftreten mehrerer Blutungspunkte oder einer Blutungslinie.	
3	Die Blutung füllt das interdendale Dreieck aus.	
4	Blut fließt über den Zahn oder die Gingiva, spontane Blutung.	

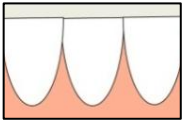
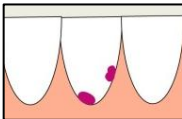
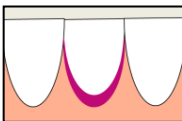
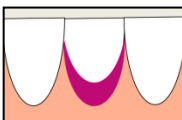
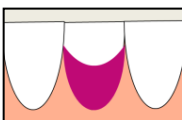
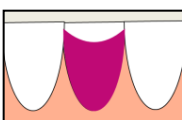
Modifizierter Plaqueindex (PLI)

Die Zähne wurden mit Plaquerelevator (Mira-2-Tone®) angefärbt und jeder Zahn an 4 Flächen (mesial, buccal, distal, lingual beziehungsweise palatinal) nach den Kriterien des modifizierten QUIGLEY UND HEIN PLI (1962) auf Vorhandensein von Plaque geprüft (Tabelle 7). Die Modifikationen lagen in der Verwendung von Plaquerelevator (O'Leary, Drake, & Naylor, 1972) und der Aufzeichnung von vier Stellen pro Zahn, während QUIGLEY UND HEIN lediglich die buccalen Flächen der Zähne beurteilten.

Die Berechnung des Plaqueindex erfolgte nach der Formel:

$$PLI = \frac{\sum \text{Indexeinzelswerte}}{\text{Zahnzahl} * 4 \text{ Stellen}}$$

Tabelle 7: Plaqueindex nach Quigley und Hein (1962).

Grad	Kriterien	
0	Keine Plaque sichtbar.	
1	Einzelne Plaqueinseln im zervikalen Bereich des Zahnes.	
2	Eine durchgehende Plaquelinie (bis zu 1 mm breit) am Sulcusrand.	
3	Die Zahnkrone ist bis zum zervikalen Drittel mit Plaque bedeckt.	
4	Die Zahnkrone ist bis zu zwei Drittel mit Plaque bedeckt.	
5	Die Zahnkrone ist mehr als zwei Drittel mit Plaque bedeckt.	

4.8 Blutentnahme

Am Tag 0 wurde vor der Probenentnahme und der klinischen Untersuchung jedem Patienten und Probanden Blut aus einer Armvene entnommen. Die Bestimmung der Blutsenkungsgeschwindigkeit und die Isolation der PMN (Boyum, 1968; Herrmann et al., 2007) erfolgten im Labor der Poliklinik für Parodontologie. Alle weiteren labormedizinischen Blutwerte, wie die Bestimmung des HbA1c, Serum-Glukose, C-Reaktives Protein (CRP) sowie ein großes Blutbild wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums Gießen und Marburg (Leiter: Prof. Dr. Renz) bestimmt.

4.9 Quantifizierung der PMN-Oberflächenantigene

Die Quantifizierung repräsentativer Zelloberflächenantigene erfolgte durch die Verwendung fluorochromkonjugierter Antikörper im Durchflussszytometer (CyAn™ ADP). Zur Probenentnahme wurden die Sulci der Zähne 13 und 23 herangezogen, wobei die Zuordnung von Test- und Kontrollzahn für jeden Studienteilnehmer per Losverfahren im Vorhinein festgelegt worden war (Urnenmodell). Um eine für die Oberflächenrezeptormarkierung ausreichende Anzahl an PMN aus dem Sulcus zu gewinnen, wurde die SF-Probe 35 Minuten nach BL-Waschung und Reiz- beziehungsweise Placeboapplikation entnommen. Diese Zeitspanne ergab sich aus den Ergebnissen der Vorversuche. Der Probenumfang für jeden Patienten beziehungsweise Probanden betrug 4 Röhrchen. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 200 g und 4°C wurde der Überstand bis zur 500 µl Markierung abgenommen und das Zellpellet vorsichtig resuspendiert. Aus jeder Probe wurden viermal 100 µl entnommen, in 4 neue Röhrchen aliquotiert und entsprechend der Herstellerangaben die Antikörper hinzugegeben. Um die Anzahl der unspezifischen Bindungen darstellen zu können, diente das erste Röhrchen jeder Probe als Isotypenkontrolle (R_{iso}). Im zweiten Röhrchen erfolgte die Markierung der CD45+ Zellen als Pan-Leukozytenmarker (R_{Pan}), im dritten die der CD11b+ (R_1) und im vierten die der CD15+ Zellen (R_2) (Abbildung 11).

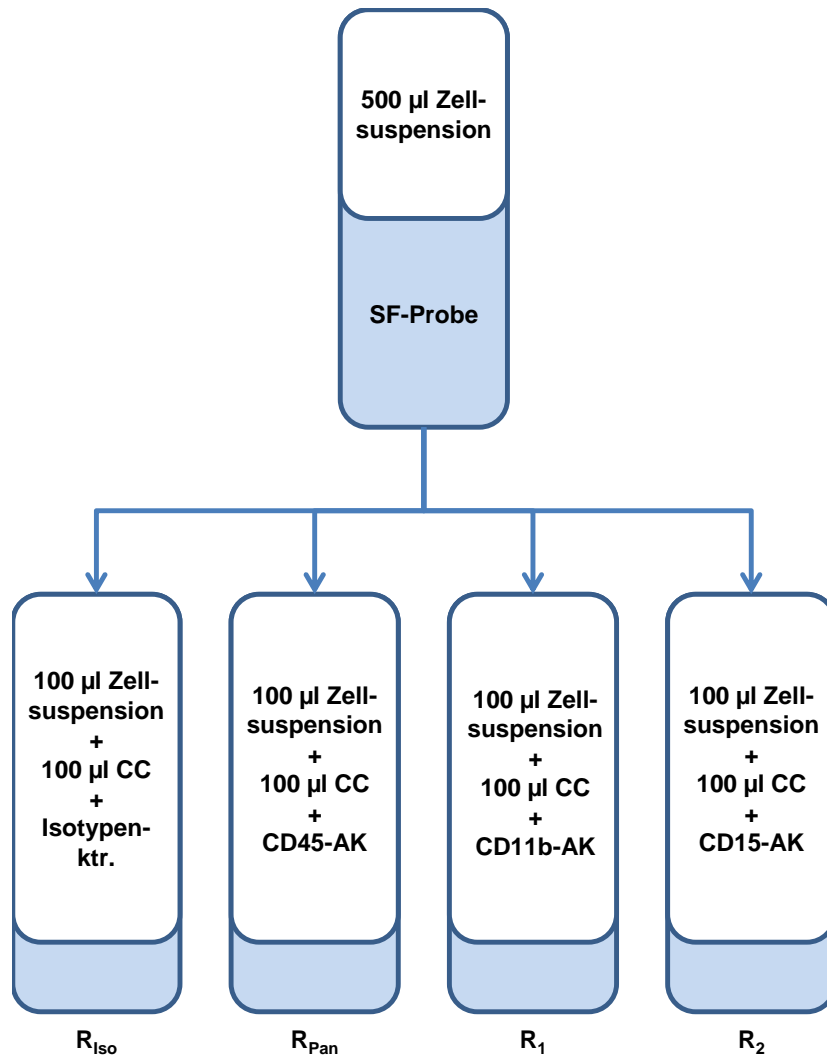


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Aufteilung der SF-Probe. CC: CytoCount™, AK: Antikörper.

Die Berechnung der Anzahl der CD45+ Zellen erfolgte mit der im Unterkapitel 4.5.2 dargestellten Formel, mit dem Unterschied der Multiplikation mit 500 µl, anstatt mit 150 µl. Bei den verwendeten Antikörpern handelte es sich ausschließlich um monoklonale anti-humane und farbmolekülkonjugierte Antikörper murinen Ursprungs (Maus anti Human). Eine detaillierte Übersicht über die verwendeten Antikörper wird in Tabelle 8 gegeben. Die Proben wurden dann bei Raumtemperatur für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Um die Anzahl der PMN bestimmen zu können, wurde jedem Röhrchen nach der Inkubationszeit 100 µl 1:10 verdünnte CytoCount™-Suspension hinzugegeben. Vor der Messung am Durchflusszytometer wurden alle Röhrchen 3 Sekunden mit dem Vortexmischer gemischt. Im Messprotokoll des Summit® Programms war zuvor ein Schwellenwert von 0,5 µm und eine Anzahl von 5000 zu messenden Ereignissen festgelegt worden.

Tabelle 8: Übersicht verwendeter Antikörper (weitere Details in Anhang F).

Antikörper	µl/Test	Konjugierter Farbstoff	PMT	Emissionsfilter	LASER
Isotypenkontrolle	5	FITC (Fluoresceiniso-thiocynat)	FL1	430/10 nm	Laser 1 (488 nm)
Anti-human CD15	20				
Isotypenkontrolle	5	APC (Allo-Phyco-Cyanin)	FL8	665/20 nm	Laser 3 (635 nm)
Anti-human CD45	5				
Anti-human CD11b	5				

PTMs: Photodetektoren. PTMs, Emissionsfilter und LASER nach Angaben des Herstellers (CyAnTMADP-Bedienungsanleitung, 2004).

4.10 Durchflussszytometrie

Die Durchflussszytometrie ist ein optisches Messverfahren für einzelne in einem Flüssigkeitsstrom fokussierte Partikel oder Zellen. Mit Hilfe der Durchflussszytometrie können diese entsprechend ihrer Größe und Granularität charakterisiert werden. Durch die Verwendung fluoreszierend markierter monoklonaler Antikörper ist es zudem möglich Antigene, wie beispielsweise bestimmte Rezeptoren, auf der Oberfläche von Zellen quantitativ nachzuweisen (Shapiro, 2003).

Durch eine hydrodynamische Fokussierung in einem laminaren Flüssigkeitsstrom werden die zu untersuchenden Zellen perlschnurartig hintereinander aufgereiht und passieren Exzitationsquellen, bei denen es sich um LASER handelt (Shapiro, 2003). Das auf die Zelle auftreffende Licht wird gestreut. Im Kleinwinkelbereich (0-10°) gestreutes Licht wird als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*; FS) bezeichnet. Das FS ist sensitiv für die Querschnittfläche der Zelle und liefert damit Informationen über die Größe der Zelle. Das im Winkel von 90° gestreute Licht (*side scatter*; SS) gibt Aufschluss über die Granularität und die Membranfaltung der Zelle (Shapiro, 2003). Das von den Fluorochromen der gebundenen Antikörper emittierte Licht wird über dichroitische Spiegel und Bandpassfilter in verschiedene Spektralbereiche aufgetrennt und trifft dann auf die Photodetektoren (*photo-multiplier-tubes*; PMTs) (Shapiro, 2003). Diese Funktionen laufen annähernd zeitgleich ab. In den PMTs wird das optische Signal in elektrische Impulse konvertiert, welche dann über den Analog-Digital-Übersetzer (*analog-digital-converter*; ADC) in ein digitales Signal umgewandelt wird. Das digitale Signal kann in einem sogenannten Punkt-Diagramm (*dot-plot*) zweidimensional oder eindimensional als Histogramm dargestellt werden. Beim Punkt-Diagramm entspricht jeder Punkt einem Ereignis (Shapiro, 2003). Werden in einem Punkt-Diagramm FS und SS

gegeneinander aufgetragen, gibt dies Aufschluss über die Größe und Granularität der Zelle. In einem Histogramm hingegen wird die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzen dargestellt. Dabei wird auf der x-Achse die Lichtintensität und auf der y-Achse die Anzahl der gezählten Ereignisse aufgetragen. Da die Emissionswellenlänge (Abstrahlungswellenlänge) länger ist als die Exzitationswellenlänge (Anregungswellenlänge), stellt sich die positive Farbmarkierung eines Antigens gegenüber einer Negativkontrolle als Rechtsverschiebung im Histogramm dar. Diese Wellenlängendifferenz wird als *Stokes-Shift* bezeichnet. Die relative Fluoreszenzintensität verhält sich dabei proportional zu der Anzahl markierter Antigene (Shapiro, 2003).

Das Gerät (CyAn™ ADP) und die dazugehörige Software (Summit®) verwalten alle Messereignisse über Auswertefenster (*gates*). Die Analyse kann so gezielt auf ausgewählte Ereignispopulationen ausgerichtet werden. Bei der Verwendung mehrerer Farbstoffe kann es zur Überlagerung der Emissionsspektren einzelner Fluorochrome kommen, was als potentielle Fehlerquelle zu betrachten ist. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Studie die Farbmarker so ausgewählt, dass sich ihre Emissionsspektren nicht überlappten und die Oberflächenrezeptormarkierung in 4 parallelen Ansätzen vorgenommen. Auf eine optionale Fluoreszenzkomensation wurde bewusst verzichtet.

4.11 Sulcusflüssigkeits-Volumenbestimmung mit dem Periotron 8000®

Um den Erfolg der Mundhygienephase zu überprüfen, wurde als weiterer Parameter die SFFR herangezogen. Die SFFR gilt als ein Indikator für entzündliche Veränderungen im parodontalen Gewebe und steigt mit dem Entzündungsgrad des gingivalen beziehungsweise parodontalen Gewebes an (Del Fabbro et al., 2001; Griffiths, Sterne, et al., 1992; Loe & Holm-Pedersen, 1965). An den Tagen -14 und 0 wurde dazu an vier zuvor festgelegten Zähnen (ein Zahn/Quadrant; $ST \leq 4$ mm) das SF-Volumen bestimmt. Nach Trockenlegung mittels Watterollen und Beseitigung möglicher supragingivaler Beläge, wurden die Zähne zur Vermeidung von Speichelkontamination mit 2-3 kurzen Luftpüsterstößen von vestibulär und oral getrocknet. Dann wurde ein genormter Filterpapierstreifen (Periopaper®) 1 mm in den Sulcus eingeführt und dort für 30 Sekunden belassen (Abbildung 12).

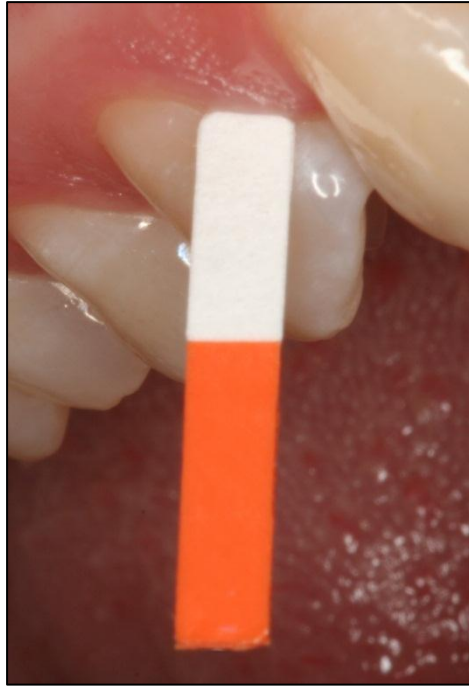


Abbildung 12: In den *Sulcus gingivae* eingeführtes Periopaper®.

Mit Blut kontaminierte Proben wurden verworfen. Die Volumenbestimmung der vom Periopaper® aufgenommenen Flüssigkeit erfolgte mit dem Periotron 8000®. Das Periopaper® wurde dazu zwischen den Messplatten des Gerätes platziert und der über Änderung des elektrischen Widerstandes ermittelte digitale Skalenwert aufgezeichnet. Durch die zuvor durchgeführte Kalibrierung des Gerätes (Poolserum Gesunder; $n = 5$) konnten die Periotronwerte (PTW) in entsprechende Sulcusflüssigkeits-Volumina umgerechnet werden. Nach dreimaliger Null-Wert-Bestimmung wurde das Poolserum mit einer 1 µl Präzisions-Spritze, in 0,10 µl-Schritten von 0,10 bis 1,00 µl auf ein Periopaper® gegeben und gemessen. Die Messreihe wurde fünfmal wiederholt (Ciantar & Caruana, 1998). Aus den arithmetischen Mittel der 5 Messreihen ergab sich eine polynomische Regressionskurve mit einem Bestimmtheitsmaß von $r^2 = 0,9995$ (Abbildung 52 und Abbildung 53, Anhang A). Die Formel der Regressionskurve diente zur Umrechnung der PTWs in die entsprechenden Sulcusflüssigkeits-Volumina:

$$y = 0,00001 * x^2 + 0,0043 * x - 0,0077$$

y = Sulcusflüssigkeits-Volumen in µl

x = PTW

4.12 PMN-Isolation aus dem peripheren Blut

Die Isolation der PMN erfolgte modifiziert nach der von BOYUM veröffentlichten Methode (Boyum, 1968; Herrmann et al., 2007). Für jeden Patienten beziehungsweise

Probanden wurden zwei Polypropylen-Falcons (PP) mit 4,3 %-Natriumcitratlösung im Labor vorbereitet. Nach Hautdesinfektion wurde mit Hilfe einer 15 G Butterfly-Nadel und einer Perfusor-Spritze Blut aus einer Armvene entnommen. Das Blut wurde zu gleichen Teilen in die vorbereiteten Falcons verteilt und diese im Anschluss mehrmals vorsichtig über Kopf gedreht um Blut und Antikoagulant zu vermischen. Es folgte die Zugabe des gleichen Volumens einer 2 % Dextran in 0,9 % NaCl-Lösung, sowie eine erneute Durchmischung. Dann wurden die Proben für 35 Minuten bei 4°C inkubiert. Das so entstandene leukozytenreiche Plasma wurde abgenommen, in ein neues Falcon überführt und zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden je 3 ml Ficoll in zwei Falcons gegeben. Nach der Zentrifugation wurde der Plasma-Überstand aspiriert und verworfen, das Zellpellet mit 0,9 %iger NaCl-Lösung resuspendiert und vorsichtig über das Ficoll geschichtet. Es folgte eine erneute Zentrifugation. Der so entstandene Überstand wurde bis auf das Zellpellet abgenommen und verworfen. Um verbliebene rote Blutzellen zu zerstören, wurde das Zellpellet hypoton lysiert und erneut zentrifugiert. Nach Abnahme und Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in PBS^(-/-) resuspendiert. Die Anzahl der PMN_{pB}/μl wurde mit Hilfe eines Hämatocytopeters bestimmt. Die PMN-Anzahl wurde dann mit PBS^(-/-) für die anschließende durchflusszytometrische Analyse und Antikörper-Färbung auf die Konzentration von 1×10^6 PMN/100 μl eingestellt. Das Gate der isolierten PMN_{pB} diente als Referenz-Gate für PMN_{SF}.

4.13 Herstellung des Chemotaktikums

Als Chemotaktikum diente das Milchprotein β-Casein. β-Casein ist ein amphiphiles Phosphoprotein von 24 kDa, welches sich unter physiologischen Bedingungen in Mizellen anordnet (Van Epps, Bankhurst, & Williams, 1977). Die Arbeitsgruppe um VAN EPPS postulierte die Hypothese eines spezifischen Rezeptors für Casein auf der Plasmamembran für PMN, welcher zu einer chemotaktischen Aktivierung der PMN führen soll (Lewis & Van Epps, 1983; Van Epps et al., 1977). Casein wurde sowohl in verschiedenen *in vivo* (Egenolf, 2010; Golub et al., 1981; Golub et al., 1982; Iacono et al., 1985; Lütke-meier, 1995) als auch in zahlreichen *in vitro* Untersuchungen (Golub et al., 1982; Srinivas et al., 2012; Wierusz-Wysocka et al., 1987) als Standardchemotaktikum verwendet.

Die Herstellung des Chemotaktikums erfolgte nach der Methode von LÜTKEMEIER (1995). Die Endkonzentration der Caseinlösung betrug 2 mg/ml. Bei dieser Konzentration ist die maximale chemotaktische Antwort der PMN zu erwarten (Golub et al., 1981).

4.14 Registrierung und Dokumentation

Die Dokumentation der Eintragungen und aller Folgeuntersuchungen erfolgten PC gestützt mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel. Patientendaten wurden in spezielle Befundschemata und in der Florida-Probe[®]-Software erfasst (Anhang E). Alle erhobenen Daten wurden über eine Identifikationsnummer anonym verwaltet.

4.15 Statistische Datenauswertung

Im Rahmen einer explorativen Datenanalyse wurden pro Studiengruppe 10 Individuen untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte im Institut für medizinische Statistik der Justus-Liebig-Universität Giessen (Dr. Bödeker) unter der Verwendung von SAS (Version 9.3).

Alle erfassten Daten (klinische Parameter, Anzahl PMN, Fluoreszenzintensitäten) wurden auf ihre Normalverteilung geprüft (Shapiro-Wilk-Test). Bei der statistischen Betrachtung auf Normalverteilung kam es zu einzelnen Zeitpunkten bei wenigen Parametern vor, dass diese normal verteilt waren. Für die meisten Parameter wurde die Normalverteilung jedoch abgelehnt. Im Sinne der Gesamtauswertungsstrategie wurde daher festgelegt, diese Parameter nicht-parametrisch zu betrachten. Für die Blutwerte (Blut-Glukose, HbA1c, CRP, Blutsenkungsgeschwindigkeit und Anzahl PMN_{pB}) und den Body-Mass-Index wurde von einer Normalverteilung ausgegangen.

Die Überprüfung der Strukturgleichheit für das Geschlecht, welches die einzige diskrete Variable darstellte, wurde mittels zweiseitigem exakten Fisher-Test vorgenommen. Die Überprüfung der Strukturgleichheit der drei Diagnosegruppen bezüglich der Daten der Mundhygieneindizes, SF-Volumina, Alter und ST wurde mit dem Mediantest durchgeführt. Zur Überprüfung der Wechselwirkung zwischen Diagnose und Test-/Kontrollzahn wurde der Kruskal-Wallis-H und der Mediantest für den Vergleich der drei Diagnosegruppen bezüglich der Differenz stimulierter (am Testzahn) minus nicht stimulierter Ansatz (am Kontrollzahn) zum Zeitpunkt 35 Minuten angewandt. Die Überprüfung eines globalen Unterschieds zwischen stimulierten und nicht stimulierten Ansatz (hinsichtlich Rezeptorexpression und PMN-Anzahl) zum Zeitpunkt 35 Minuten wurde mittels Vorzeichen- und Vorzeichen-Rang-Test für alle Diagnosegruppen gemeinsam bezüglich der Differenz stimulierter (am Testzahn) minus nicht stimulierter Ansatz (am Kontrollzahn) zum Zeitpunkt 35 Minuten durchgeführt. Die Überprüfung eines globalen Unterschieds zwischen den drei Diagnosegruppen zum Zeitpunkt 35 Minuten erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-H-Test und dem Mediantest für den Vergleich der drei Diagnosegruppen bezüglich der Summe Testzahn plus Kontrollzahn, gefolgt von den entspre-

chenden Anschluss tests. Die Auswertung der Blutwerte, des Body-Mass-Index, der Zahnanzahl, der mittleren Gesamtsondierungstiefe, des klinischen Attachmentniveaus und der Stellen mit Blutung auf Sondierung erfolgte mittels t-Test für unabhängige Stichproben. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

5. Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der Vorversuche

5.1.1 Etablierung der Methodik

Erste Vorversuche dienten der Erlernung der angewandten Methodik zur SF-Entnahme. Die aus den ersten Vorversuchen stammenden SF-Proben wurden mittels Zytocentrifuge auf einen Objektträger aufgebracht. Nach Pappenheim-Färbung konnten in den Zytocentrifugenpräparaten lichtmikroskopisch PMN und abgeschilferte Epithelzellen sowie Epithelzelltrümmer erkannt werden (Abbildung 13 A-C).

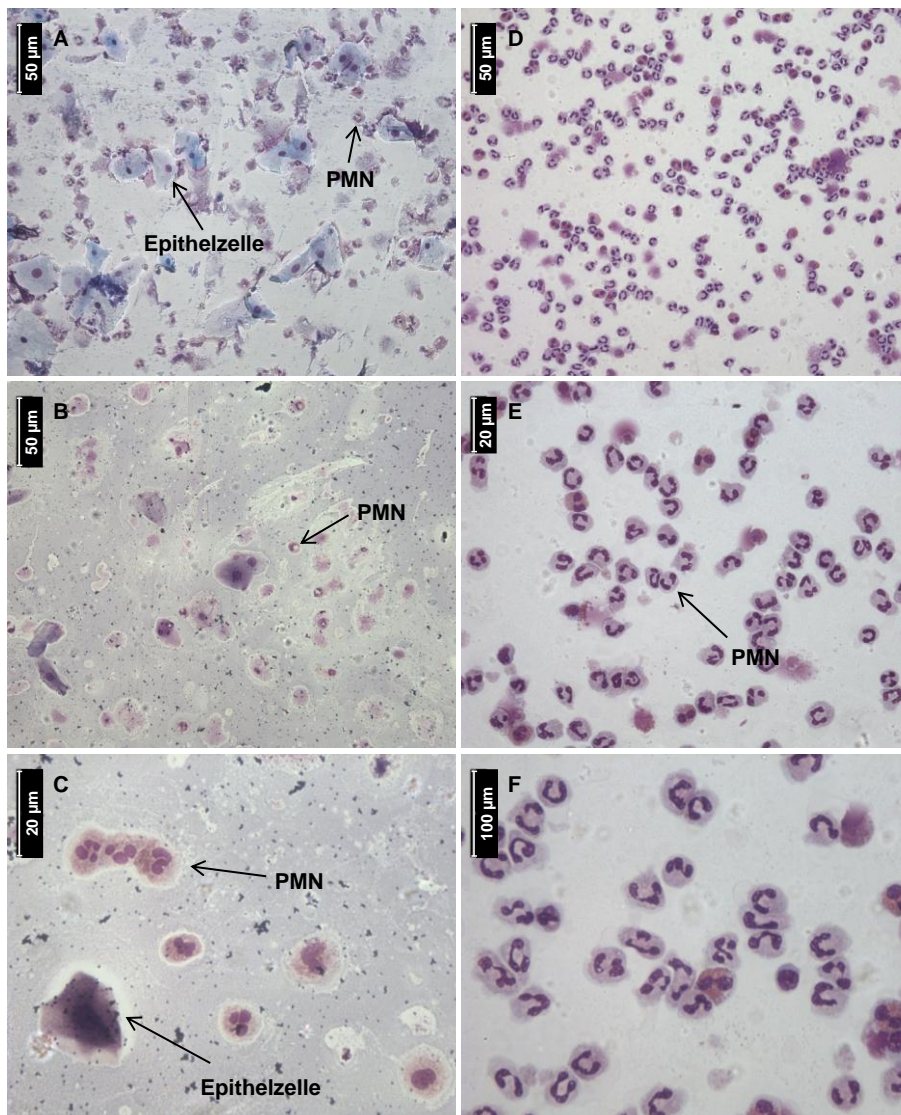


Abbildung 13: Zytocentrifugenpräparate; Pappenheim-Färbung. **A-C:** Sulcusflüssigkeits-Proben; **D-F:** Isolierte PMN.

Weitere Vorversuche zeigten, dass die aus dem *Sulcus gingivae* gewonnenen PMN_{SF} bei durchflusszytometrischer Analyse eine gut abzugrenzende und eindeutig zu

identifizierende Population bildeten. Die PMN_{SF} konnten gut von den anderen gemessenen Ereignissen, bei welchen es sich vermutlich zum größten Teil um Zelltrümmer oder sonstige Partikel aus dem Sulcus handelte, abgegrenzt werden (Abbildung 14).

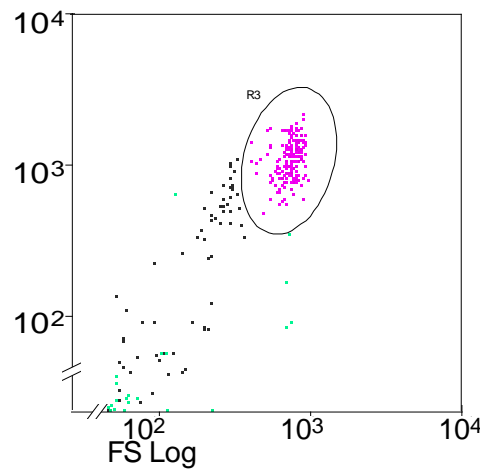


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Darstellung aus dem *Sulcus gingivae* gewonnener PMN_{SF} . Vorwärtssreuung (FS) vs. seitliche Streuung (SS); Gate R3: PMN_{SF} .

Die durch Isolierung aus peripherem Blut gewonnenen PMN_{pB} stellten sich ebenfalls sowohl lichtmikroskopisch (Abbildung 13 D-F), als auch im Durchflusszytometer als eindeutige Population dar (Abbildung 15).

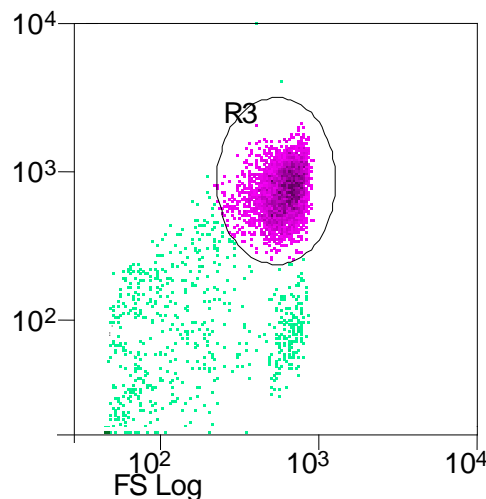


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Darstellung aus peripherem Blut isolierter PMN_{pB} . Vorwärtssreuung (FS) vs. seitliche Streuung (SS); Gate R3: PMN-Population (4041 Ereignisse). Total: 5000 gezählte Ereignisse. Der Anteil der PMN lag in der gemessenen Probe bei 81 % aller erfassten Ereignisse.

Das zuvor festgelegte Protokoll zur Antikörperfärbung und die anschließende durchflusszytometrische Analyse der PMN_{SF} wurde durch mehrfache positive Testung etabliert (Abbildung 16).

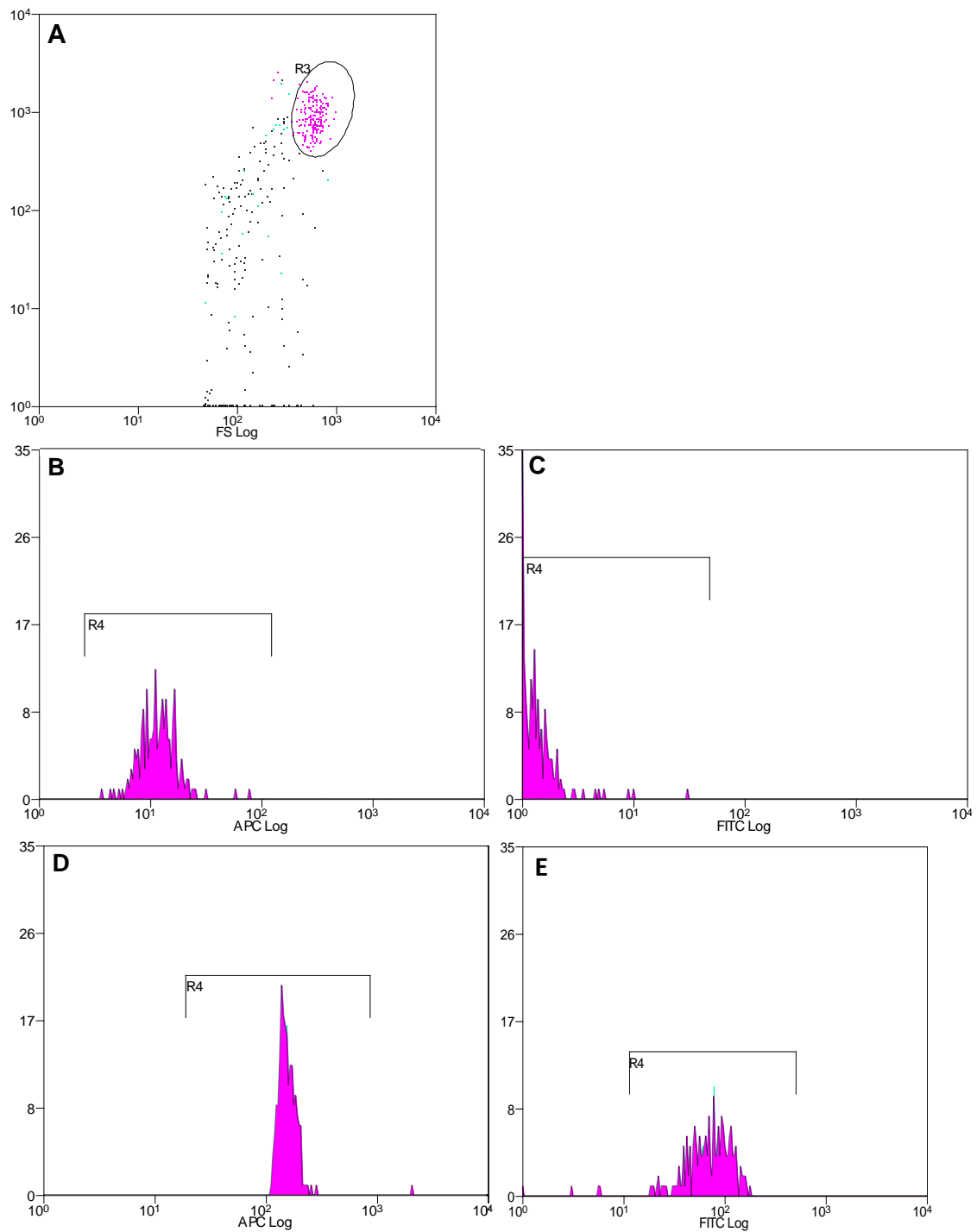


Abbildung 16: Repräsentative durchflusszytometrische Darstellung der Oberflächenrezeptormarkierung von PMN_{SF}. **A-C:** Isotypenkontrolle; **A:** Darstellung der Isotypenkontrolle als Punktdiagramm; **B:** Histogramm der Isotypenkontrolle für APC; **C:** Histogramm der Isotypenkontrolle für FITC; **D:** Antikörperfärbung CD11b-APC, im Vergleich zur Isotypenkontrolle (B) eine positive Fluoreszenz für APC (eindeutige Verschiebung nach rechts im Diagramm); **E:** Antikörperfärbung CD15-FITC, im Vergleich zur Isotypenkontrolle (C) eine positive Fluoreszenz für FITC (eindeutige Verschiebung nach rechts im Diagramm).

5.1.2 PMN_{SF}-Einwanderungskinetik

Die PMN_{SF}-Einwanderungskinetik über 45 Minuten zeigte, dass sich nach inflammatorischer Reizapplikation mittels Casein mehr PMN_{SF} aus dem Sulcus des Testzahnes (im Folgenden als stimulierter Ansatz bezeichnet) gewinnen ließen als aus dem des Kontrollzahnes, in den das Placebo appliziert wurde (im Folgenden als nicht stimulierter Ansatz bezeichnet). Das Maximum der medianen PMN-Anzahl lag in allen Gruppen bei 15 Minuten. Bei den Patienten mit Diabetes und Parodontitis wurde zum Entnahmzeitpunkt 45 Minuten ein erneuter Anstieg der Zellzahl beobachtet. Die Diabetiker zeigten zu jedem Zeitpunkt sowohl im stimulierten als auch im nicht stimulierten Ansatz die höchsten medianen Zellzahlen. Die Zellzahlen der Gesunden und der Parodontitispatienten waren während des gesamten Verlaufs ähnlich (Abbildungen 17-20).

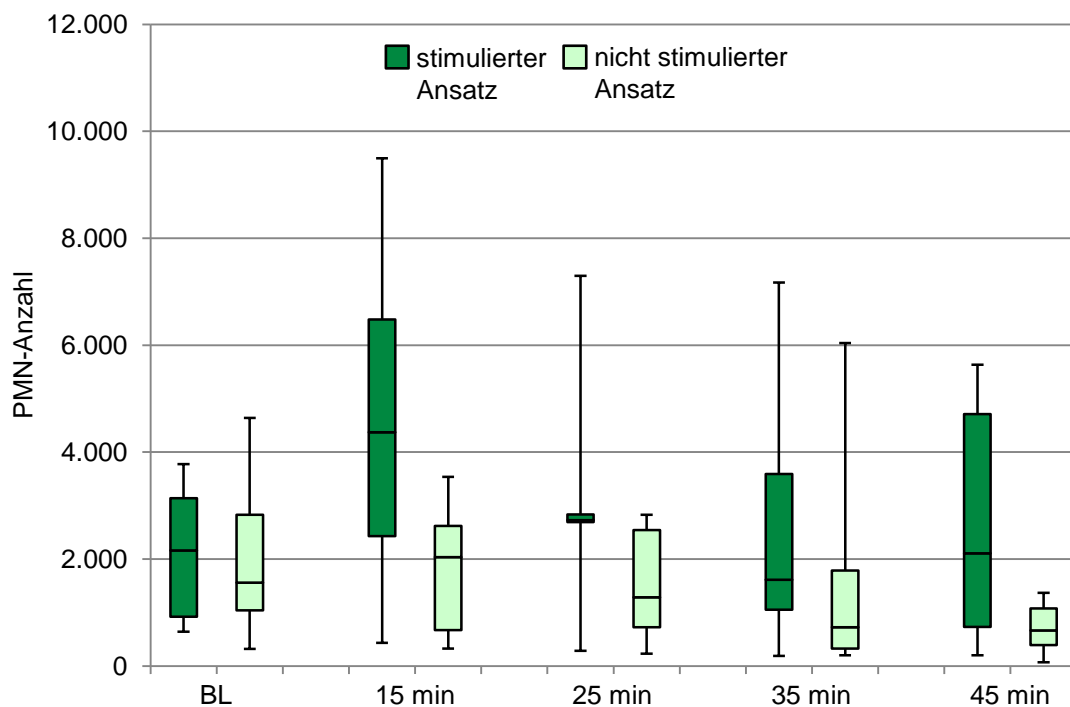


Abbildung 17: PMN_{SF}-Einwanderungskinetik bei Gesunden.

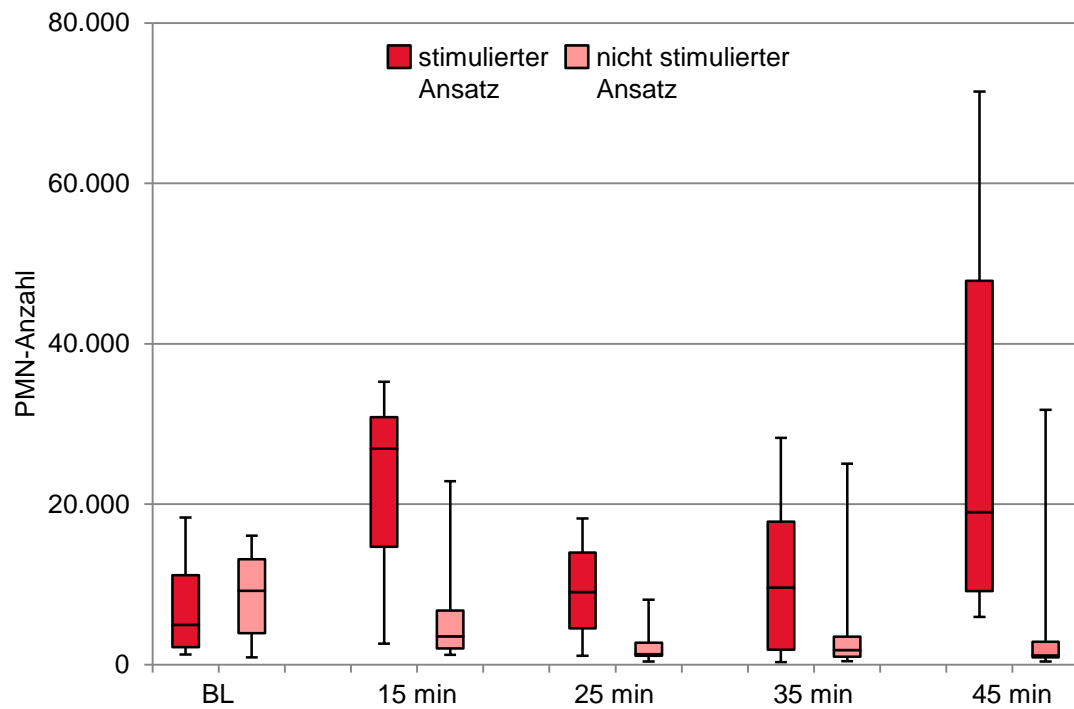


Abbildung 18: PMN_{SF}-Einwanderungskinetik bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis.

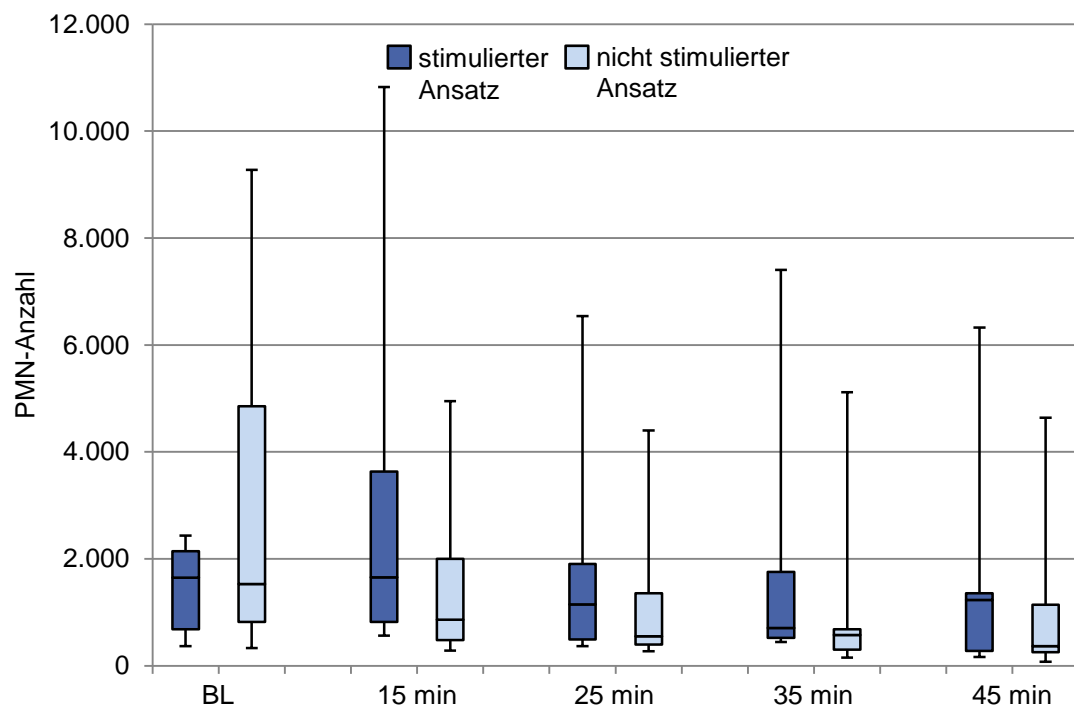


Abbildung 19: PMN_{SF}-Einwanderungskinetik bei Parodontitispatienten.

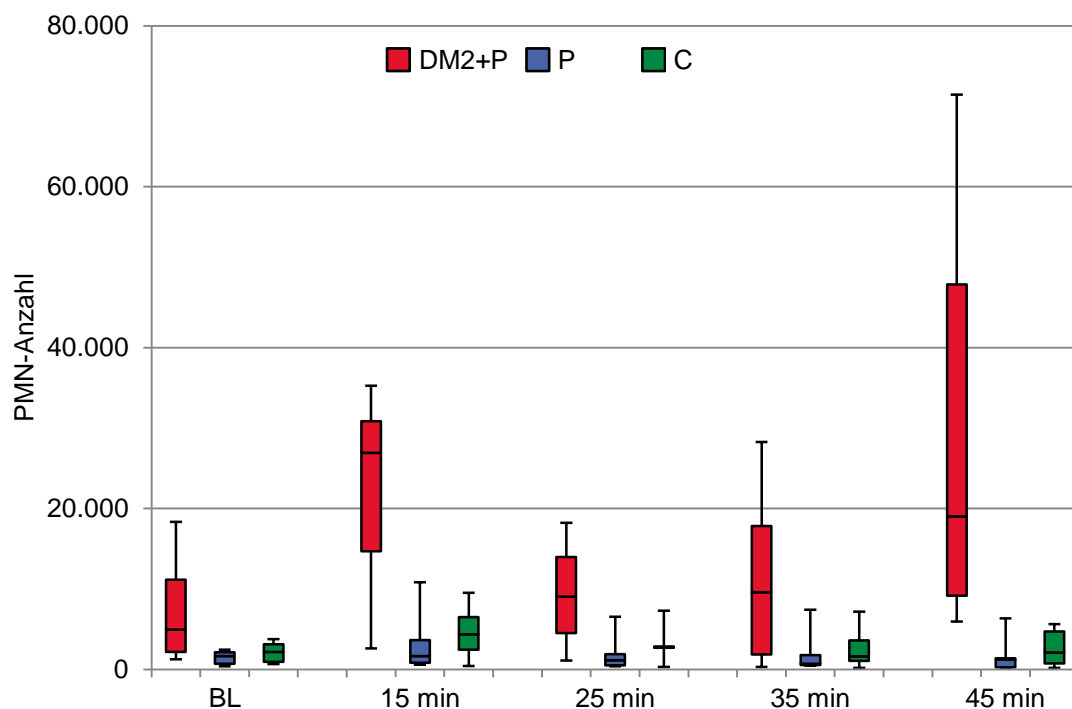


Abbildung 20: PMN_{SF}-Einwanderungskinetik der stimulierten Ansätze aller Diagnosegruppen.

Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche und unter Berücksichtigung des Patientenkomforts wurde das Zeitintervall zur Probenentnahme nach Reizapplikation für den Hauptversuch auf 35 Minuten festgesetzt. Die Anzahl der bis zu diesem Zeitpunkt akkumulierten Zellen ist in allen Diagnosegruppen für eine Zellfärbung ausreichend.

5.2 Demographische Daten

Die demografischen Daten der einzelnen Studiengruppen sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Demografische Daten der Studiengruppen.

Diagnose	mittleres Alter \pm SD	männlich	weiblich
C	44 \pm 16 Jahre	7	3
DM2+P	57 \pm 10 Jahre	7	3
P	43 \pm 12 Jahre	2	8

C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten; SD: Standardabweichung.

Bei der Überprüfung der Strukturgleichheit zwischen den Diagnosegruppen ergaben sich für die diskrete Variable Geschlecht ($p = 0,05$; Exakter Fisher-Test) und das Alter ($p = 0,031$; Mediantest) Unterschiede.

5.3 Klinische Beschreibung der Gruppen

5.3.1 Zahnanzahl

Die Anzahl der Zähne war bei den Diabetikern und den Parodontitispatienten mit $25,0 \pm 4,1$ und $25,4 \pm 2,8$ Zähnen gleich. Die Gesunden hatten zwar die meisten Zähne ($27,8 \pm 2,7$ Zähne) (Tabelle 10), statistische Unterschiede bestanden jedoch nicht ($p = 0,1465$; einfaktorielle ANOVA).

Tabelle 10: Deskriptive Auswertung der Zahnanzahl.

Diagnose	Minimum	Maximum	Median	MW \pm SD
C	22	32	28	$27,8 \pm 2,7$
DM2+P	17	30	25,5	$25,0 \pm 4,1$
P	21	28	26	$25,4 \pm 2,8$

C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung.

5.3.2 Sondierungstiefe des Gesamtgebisses (ST_{ges})

Die mittlere Sondierungstiefe der Patienten mit DM und Parodontitis lag mit $2,69 \pm 1,13$ mm in einem ähnlichen Bereich wie die der Parodontitispatienten mit $2,50 \pm 1,09$ mm. In beiden Gruppen wurden Maximalwerte von 9 mm gemessen. Die maximale Sondierungstiefe lag bei den Gesunden bei 4 mm und die mittlere Sondierungstiefe war im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen mit $1,86 \pm 0,68$ mm deutlich geringer (Tabelle 11). Die Unterschiede zwischen den Gesunden und den Diabetikern sowie zwischen den Gesunden und den Parodontitispatienten waren eindeutig (jeweils $p < 0,001$, t-Test), wohingegen zwischen den beiden Gruppen mit Parodontitis keine Unterschiede bestanden ($p > 0,05$; t-Test).

Tabelle 11: Deskriptive Statistik der Sondierungstiefe (mm) des Gesamtgebisses.

Diagnose	Minimum	Maximum	Median	MW \pm SD
C	0,2	4,0	1,8	$1,86 \pm 0,68$
DM2+P	0,6	9,0	2,4	$2,69 \pm 1,13$
P	0,4	9,0	2,0	$2,50 \pm 1,09$

C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung.

5.3.3 Attachmentniveau des Gesamtgebisses (CAL)

Das mittlere Attachmentniveau (CAL) war bei den Gesunden mit $2,06 \pm 0,80$ mm ebenfalls am geringsten. Das Attachmentniveau der Diabetiker betrug $3,03 \pm 1,43$ mm und das der Parodontitispatienten $2,84 \pm 1,29$. Bei den Diabetikern wurden Maximalwerte bis 13 mm gemessen, bei den Parodontitispatienten bis 11 mm und bei den Gesunden bis 10 mm (Tabelle 12). Insgesamt ergaben sich für die Gruppen keine Unterschiede ($p = 0,1595$; einfaktorielle ANOVA).

Tabelle 12: Deskriptive Statistik des Attachmentniveaus (mm) des Gesamtgebisses.

Diagnose	Minimum	Maximum	Median	MW \pm SD
C	0,2	10,0	2,0	$2,06 \pm 0,80$
DM2+P	0,6	13,0	3,0	$3,02 \pm 1,43$
P	0,4	11,0	3,0	$2,84 \pm 1,29$

C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung.

5.3.4 Blutung auf Sondierung (BOP)

Bei den Diabetikern wurde im Mittel bei $34,5 \pm 24,2$ % aller Sondierungsstellen eine Blutung auf Sondierung diagnostiziert. Die Parodontitispatienten zeigten bei $19,0 \pm 11,1$ % aller Messstellen eine Blutung. Die geringsten Werte für BOP wurden bei den Gesunden festgestellt (Tabelle 13). Eindeutige Unterschiede bestanden zwischen den Gesunden und den Diabetikern mit Parodontitis ($p < 0,001$; t-Test).

Tabelle 13: Deskriptive Statistik der Sondierungsblutung (%).

Diagnose	Minimum	Maximum	Median	MW \pm SD
C	0,0	30,0	9,0	$6,3 \pm 9,3$
DM2+P	4,9	79,2	39,2	$34,5 \pm 24,2$
P	5,1	41	15,9	$19,0 \pm 11,1$

C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung.

5.4 Sondierungstiefen an Test- und Kontrollzähnen

Die Mediane der mittleren Sondierungstiefen (ST) der Diabetiker mit Parodontitis und der Parodontitispatienten waren ähnlich. Die Gesunden zeigten den niedrigsten

Median der mittleren ST (Abbildung 21 und Tabelle 14). Die Unterschiede zwischen den ST der Test- und Kontrollzähne innerhalb einer Studiengruppe lagen im Rahmen der Messgenauigkeit.

Tabelle 14: Deskriptive Statistik der Sondierungstiefen an Test- und Kontrollzahn (mm).

Diagnose	Testzahn		Kontrollzahn	
	Median	MW \pm SD	Median	MW \pm SD
P	2,2	2,1 \pm 0,2	2,3	2,2 \pm 0,4
DM2+P	2,3	2,3 \pm 0,2	2,2	2,3 \pm 0,4
C	1,8	1,3 \pm 0,4	1,8	1,7 \pm 0,3

C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung.

Zur Überprüfung der Strukturgleichheit der Diagnosegruppen wurden die Differenzen der mittleren ST an Test- und Kontrollzahn verglichen. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden nicht festgestellt ($p = 0,314$; Mediantest).

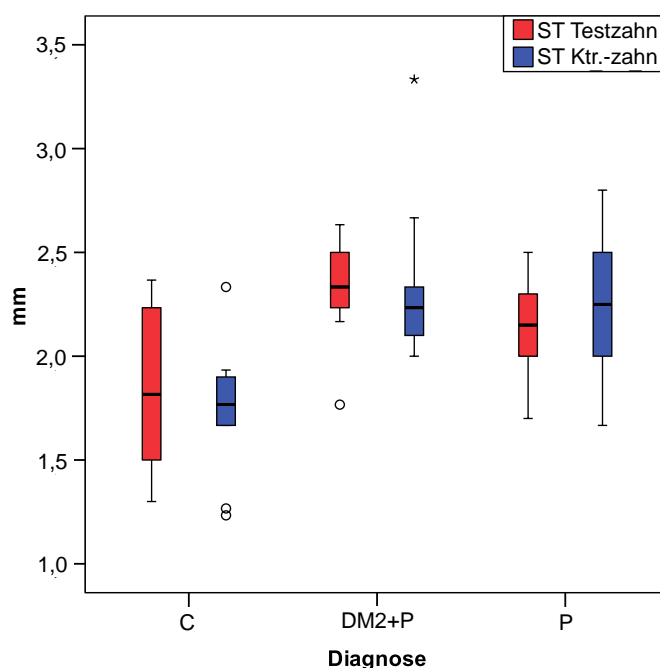


Abbildung 21: Sondierungstiefen an Test- und Kontrollzähnen. Ktr.-zahn: Kontrollzahn. C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten.

5.5 Mundhygienephase

5.5.1 Papillenblutungsindex (PBI)

Am Tag -14 lag der PBI bei 5 Studienteilnehmern bereits bei 0 (2 C; 1 DM2+P; 2 P). Bei 4 dieser Personen konnte auch am Tag 0 ein PBI von 0 befundet werden, wohingegen bei einem Patient (C) mit einem Indexwert von 0,06 eine leichte Veränderung beobachtet wurde (Abbildung 22).

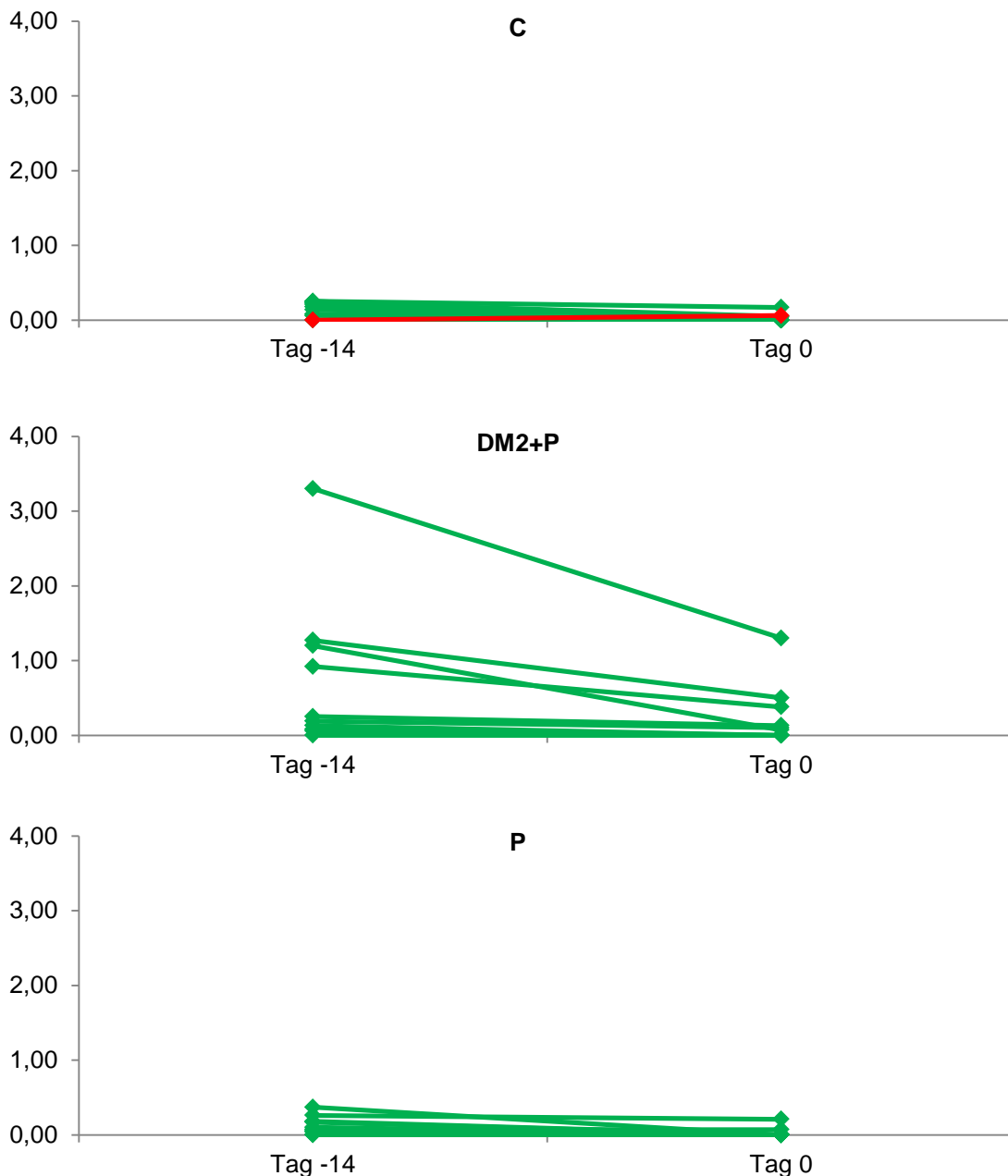


Abbildung 22: Veränderungen des Papillenblutungsindex (PBI) der Studienteilnehmer für jede Diagnosegruppe. Unveränderte oder verbesserte Indexwerte sind in grün dargestellt, verschlechterte in rot. C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten.

Die übrigen 25 Studienteilnehmer zeigten nach Abschluss der Mundhygienephase eine Verbesserung des PBI (Abbildung 22). Bei keinem Patienten wurde am Tag der Probenentnahme eine Blutung an Test- oder Kontrollzahn festgestellt.

Mit einem Median des PBI von 0,22 und 0,09 wiesen die Patienten mit Diabetes sowohl am Tag -14 als auch am Tag 0 die höchsten Blutungswerte auf. Bei den Parodontitispatienten betrug der PBI an Tag -14 im Median 0,16 und konnte bis zum Tag 0 auf einen Indexwert von 0 gesenkt werden. Die Gesunden zeigten zu Beginn der Mundhygienephase mit einem medianen PBI von 0,09 den niedrigsten Ausgangswert, der nach 14 Tagen ebenfalls auf 0 gesenkt werden konnte. Abbildung 23 zeigt die PBI aller Gruppen an den Tagen -14 und 0. In Tabelle 15 sind die Mediane und Mittelwerte des PBI an beiden Tagen zusammengefasst.

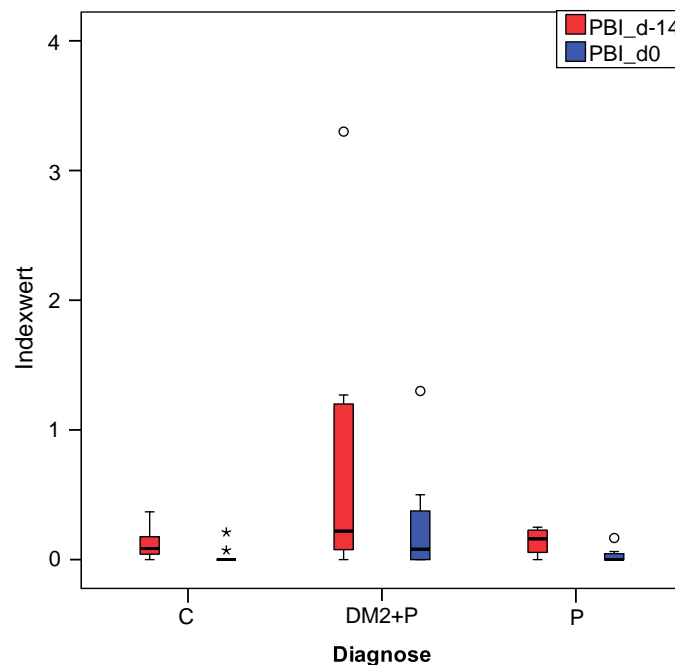


Abbildung 23: PBI am Tag -14 und Tag 0. PBI: Papillenblutungsindex; d-14: Tag -14; d0: Tag 0; C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten.

Tabelle 15: Mediane und Mittelwerte des Papillenblutungsindex (Saxer & Mühlemann, 1975).

Diagnose	Tag	Median	MW \pm SD
C	-14	0,09	0,12 \pm 0,11
	0	0,00	0,02 \pm 0,06
DM2+P	-14	0,22	0,74 \pm 0,97
	0	0,09	0,25 \pm 0,39
P	-14	0,16	0,14 \pm 0,09
	0	0,00	0,03 \pm 0,05

C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung.

Die Überprüfung der Strukturgleichheit der Studiengruppen bezüglich des PBI ergab keine Unterschiede zwischen den Gruppen ($p = 0,1997$; Mediantest).

5.5.2 Plaqueindex (PLI)

Durch die Maßnahmen der präexperimentellen Mundhygienephase konnte der PLI von 27 Personen verbessert werden. Bei 3 Studienteilnehmer (2 C, 1 P) wurde eine leichte Verschlechterung des Wertes beobachtet (C: von 0,79 auf 0,81 und von 1,18 auf 1,37; P: von 0,64 auf 0,94) (Abbildung 24).

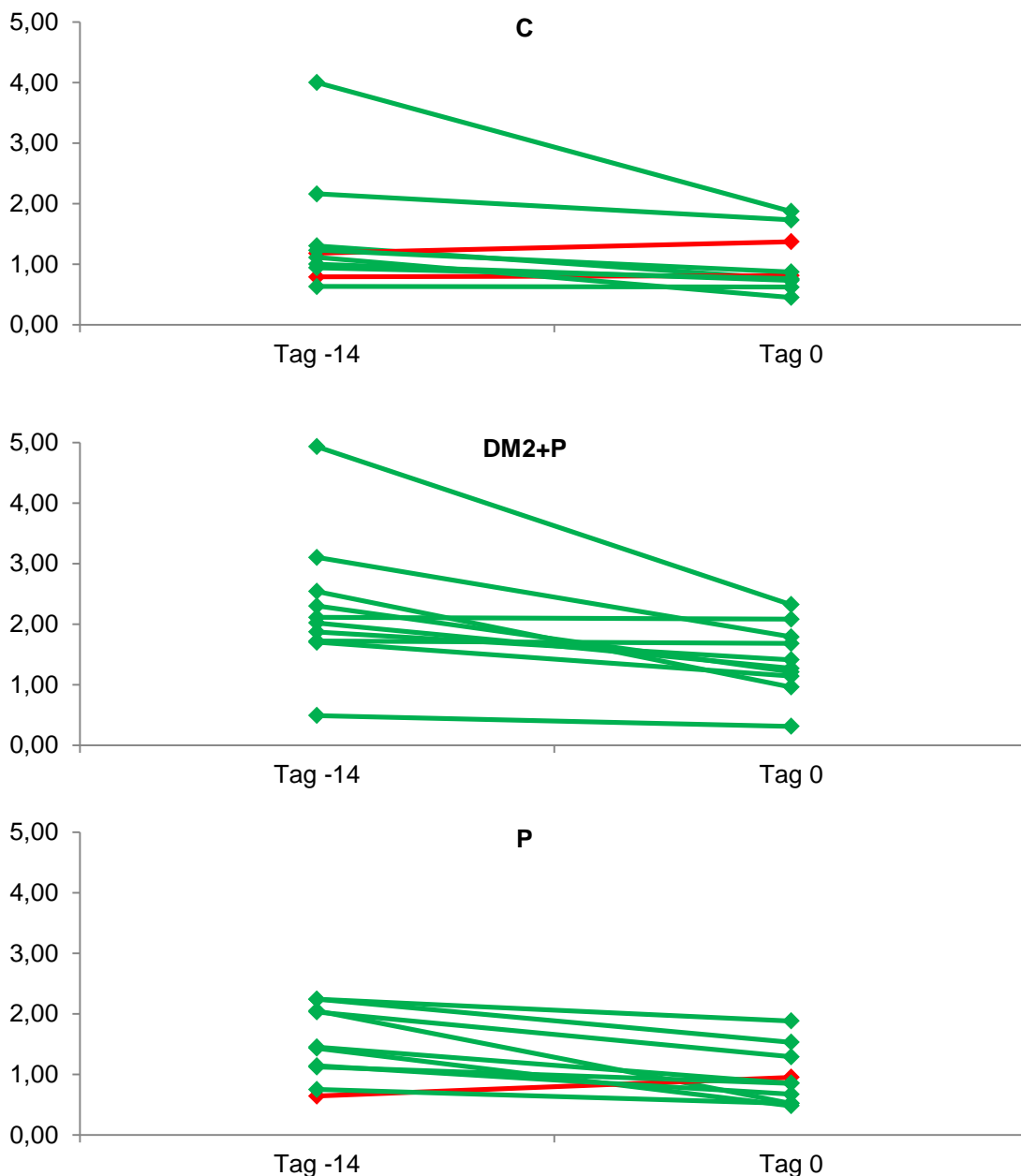


Abbildung 24: Veränderungen des Plaqueindex der Studienteilnehmer für jede Diagnosegruppe. Unveränderte oder verbesserte Indexwerte sind in grün dargestellt, verschlechterte in rot. C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten.

Auch beim PLI wurde an den Tagen -14 und 0 mit den Medianen der Indexwerte von 2,07 und 1,34 bei den Diabetikern am meisten Plaque festgestellt. Die Parodonti-

tispatienten zeigten mit einem Wert von 1,44 an Tag -14 und 0,85 an Tag 0 etwas bessere Ergebnisse. Am wenigsten Plaque wurde zu beiden Zeitpunkten mit Medianwerten des PLI von 1,15 und 0,79 bei den Gesunden festgestellt. Abbildung 25 zeigt die Boxplot-Darstellung der PLI an den Tagen -14 und 0. In Tabelle 16 sind die Mediane und Mittelwerte des PLI für die beiden Tage zusammengefasst.

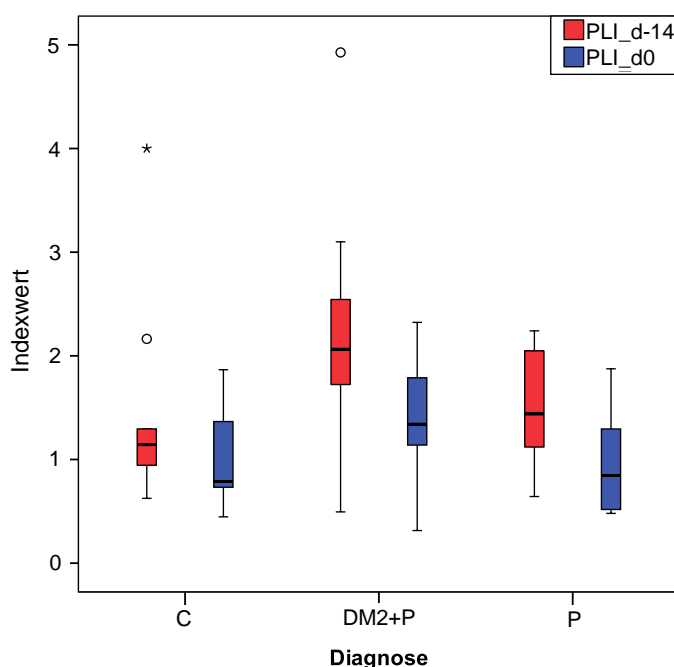


Abbildung 25: Plaqueindex an Tag -14 und Tag 0 PLI: Plaqueindex; d-14: Tag -14; d0: Tag 0; C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten.

Tabelle 16: Mediane und Mittelwerte des Plaqueindex (Quigley & Hein, 1962).

Diagnose	Tag	Median	MW \pm SD
C	-14	1,15	1,43 \pm 0,94
	0	0,79	1,00 \pm 0,46
DM2+P	-14	2,07	2,28 \pm 1,09
	0	1,34	1,42 \pm 0,55
P	-14	1,44	1,51 \pm 0,57
	0	0,85	0,95 \pm 0,45

C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung.

Eine Strukturgleichheit der Diagnosegruppen bezüglich des PLI ist aufgrund der hohen Werte der Diabetiker mit hoher Wahrscheinlichkeit abzulehnen ($p = 0,0097$; Mediantest).

5.5.3 Sulcusflüssigkeits (SF)-Volumen

Nach Umrechnung der digitalen Skalenwerte in μl -Angaben wurden die Mittelwerte der einzelnen Patienten für den jeweiligen Tag gebildet. Eine Abnahme des SF-Volumens vom Tag -14 auf den Tag 0 wurde bei 27 Studienteilnehmern beobachtet. Bei einem Studienteilnehmer (C) blieb der Wert mit $0,10 \mu\text{l}$ gleich. Bei 2 weiteren Studienteilnehmern (1 DM2+P, 1 C) wurde eine leichte Zunahme des SF-Volumens festgestellt (DM2+P: von $0,20 \mu\text{l}$ auf $0,26 \mu\text{l}$; C: von $0,2 \mu\text{l}$ auf $0,21 \mu\text{l}$) (Abbildung 26).

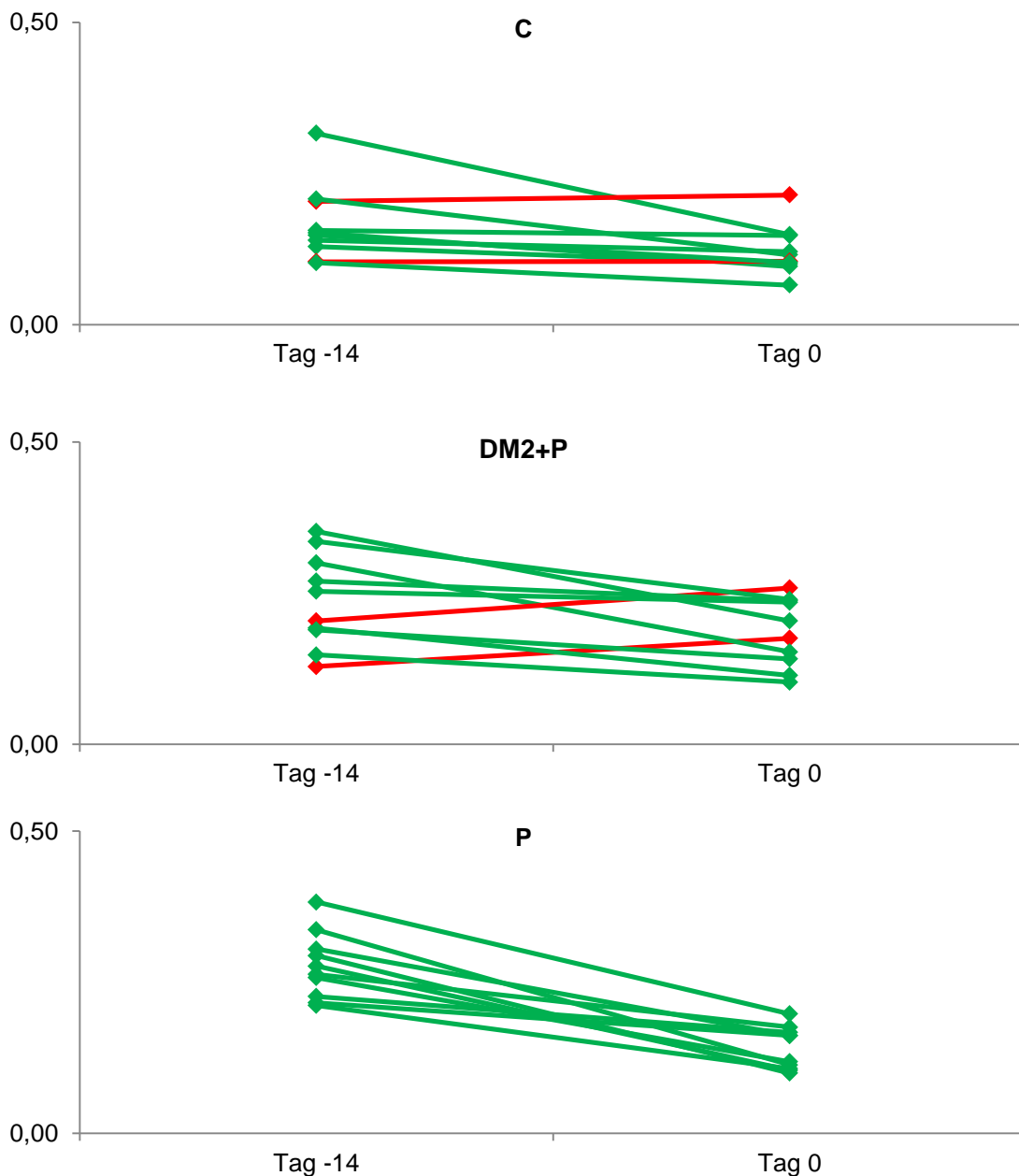


Abbildung 26: Veränderungen der Sulcusflüssigkeits-Volumina der Studienteilnehmer für jede Diagnosegruppe (Angaben in μl). Eine Abnahme sowie gleichbleibende Volumina sind in grün dargestellt, zunehmende Volumina in rot; C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten.

Am Tag -14 wiesen die Patienten mit Parodontitis den höchsten Median der SF-Volumina auf (0,27 μ l). Am Tag 0 zeigten sich die höchsten medianen Werte bei den Patienten mit DM und Parodontitis (Median: 0,19 μ l). Die niedrigsten medianen Werte wiesen sowohl am Tag -14 als auch am Tag 0 die Gesunden auf (Tabelle 17 und Abbildung 27). Die Überprüfung der Strukturgleichheit der Diagnosegruppen bezüglich der SF-Volumina am Tag 0 ergab, dass die Nullhypothese (keine Unterschiede zwischen den Gruppen) nicht abgelehnt werden kann ($p = 0,2130$; Mediantest).

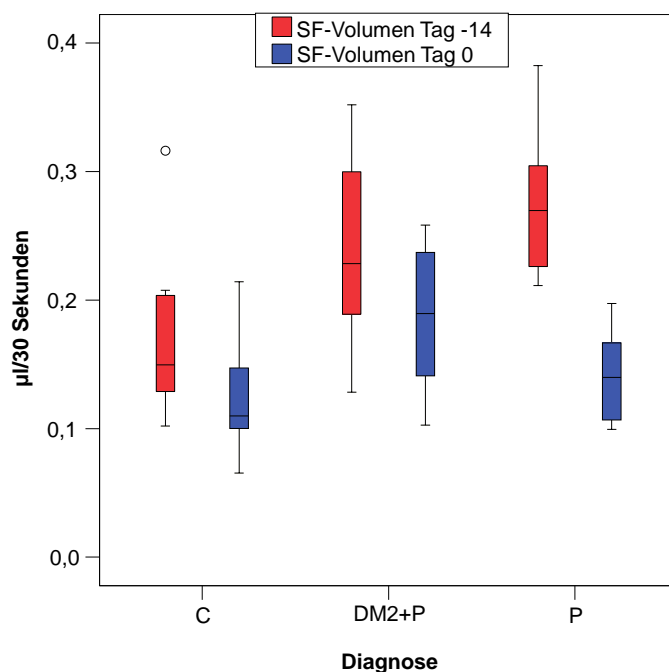


Abbildung 27: Sulcusflüssigkeits-Volumen pro 30 Sekunden an Tag -14 und Tag 0. SF: Sulcusflüssigkeit. C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten.

Tabelle 17: Mediane und mittlere Sulcusflüssigkeit-Volumina/30 Sekunden (μ l).

Diagnose	Tag	Median	MW \pm SD
C	-14	0,15	0,17 \pm 0,06
	0	0,11	0,12 \pm 0,04
DM2+P	-14	0,23	0,24 \pm 0,07
	0	0,19	0,19 \pm 0,05
P	-14	0,27	0,28 \pm 0,05
	0	0,14	0,14 \pm 0,03

C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung.

5.5.4 Klinisches Erscheinungsbild und Orthopantomogramme

Die Abbildungen 28 bis 30 zeigen das klinische Erscheinungsbild der verschiedenen Gruppen am Tag der Probenentnahme sowie die dazugehörigen Orthopantomogramme (OPGs).

A



B



Abbildung 28: Gesunder Proband. **A:** Klinisches Erscheinungsbild nach Abschluss der Mundhygienephase. **B:** OPG.

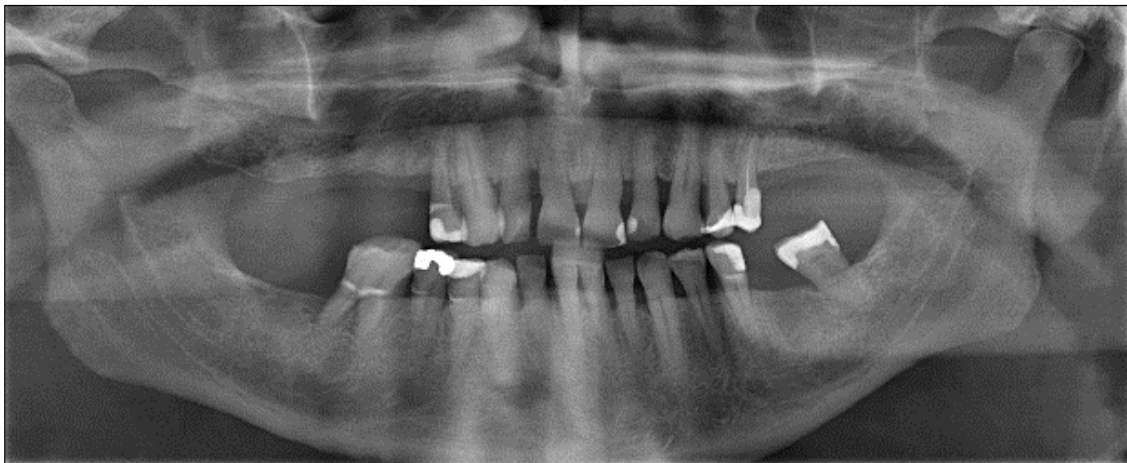
A**B**

Abbildung 29: Patient mit Diabetes Typ 2 und chronischer Parodontitis. **A:** Klinisches Erscheinungsbild nach Abschluss der Mundhygienephase. **B:** OPG.

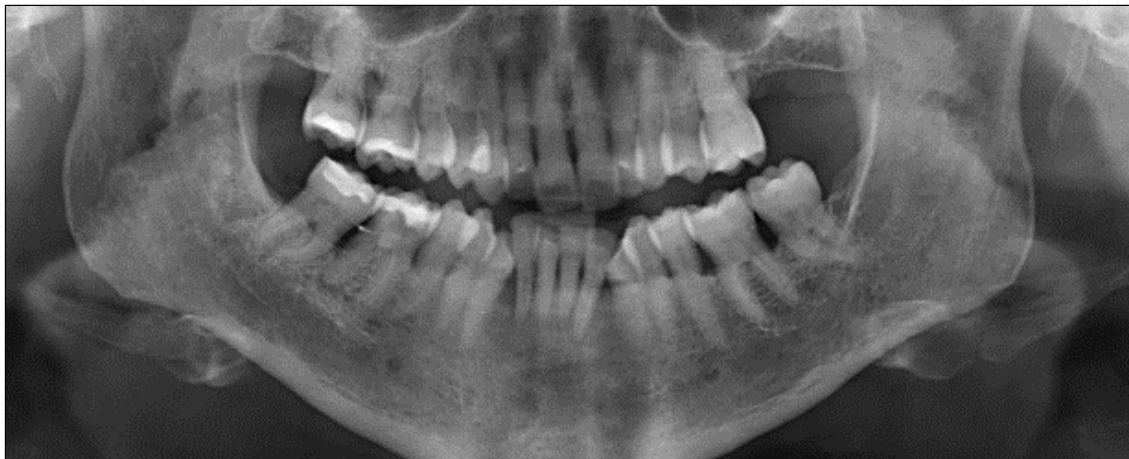
A**B**

Abbildung 30: Patient mit chronischer Parodontitis. **A:** Klinisches Erscheinungsbild nach Abschluss der Mundhygienephase. **B:** OPG.

5.6 Hämatologie und Diagnostik

5.6.1 Plasma-Glukose-Werte

Erwartungsgemäß zeigten die Diabetiker die höchsten Plasma-Glukose-Werte (156 ± 37 mg/dl). Der Maximalwert lag in dieser Gruppe bei 218 mg/dl. Die Mittelwerte der Parodontitispatienten (91 ± 13 mg/dl) und der gesunden Kontrollen (91 ± 17 mg/dl) waren nahezu identisch (Tabelle 18). Die Unterschiede zwischen den Diabetikern und den beiden anderen Gruppen waren in beiden Fällen statistisch eindeutig ($p < 0,001$; t-Test), wohingegen zwischen den Gesunden und den Parodontitispatienten keine Unterschiede bestanden ($p = 0,528$; t-Test) (Abbildung 31).

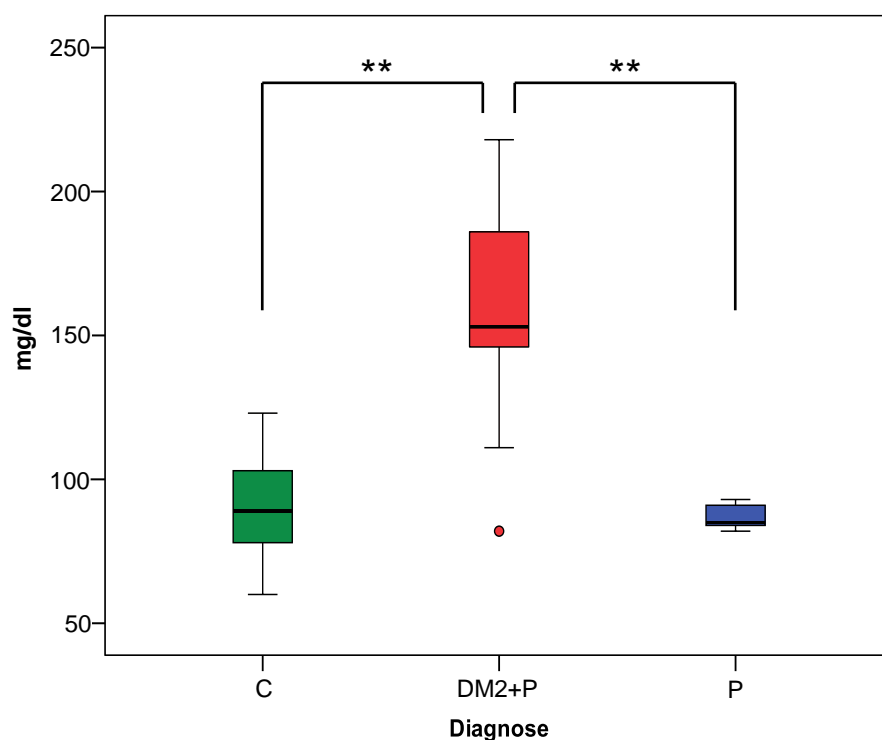


Abbildung 31: Plasma-Glukose-Werte. ** = $p < 0,01$; C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten

Tabelle 18: Deskriptive Statistik der Plasma-Glukose-Werte (mg/dl).

Diagnose	Minimum	Maximum	Median	MW ± SD
C	60	123	89	91 ± 17
DM2+P	82	218	153	156 ± 37
P	82	127	88	91 ± 13

C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten; MW: ;Mittelwert; SD: Standardabweichung.

5.6.2 HbA1c-Werte

Die festgestellten HbA1c-Werte bei den Diabetikern lagen zwischen 6,2 und 10,9 %, bei den Parodontitispatienten zwischen 5,2 % und 5,9 % und bei den Gesunden zwischen 4,7 % und 5,9 %. Der Mittelwert der HbA1c-Werte der Diabetespatienten lag mit $7,5 \pm 1,4$ % deutlich höher als der der Parodontitispatienten ($5,5 \pm 0,3$ %) und der Gesunden ($5,3 \pm 0,3$ %) (Tabelle 19). Die Unterschiede zwischen den Diabetikern und den beiden anderen Gruppen waren eindeutig ($p = 0,001$ und $p = 0,002$; t-Test). Zwischen den Parodontitispatienten und den Gesunden bestanden keine Unterschiede ($p = 0,218$; t-Test) (Abbildung 32).

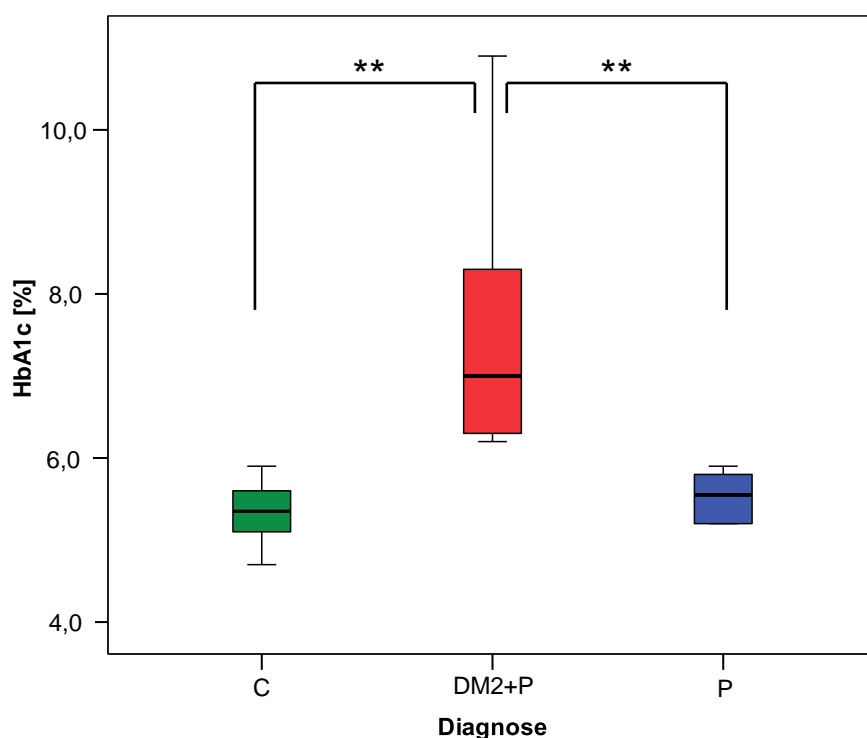


Abbildung 32: HbA1c-Werte. ** = $p < 0,01$; C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten.

Tabelle 19: Deskriptive Statistik der HbA1c-Werte (%).

Diagnose	Minimum	Maximum	Median	MW \pm SD
C	4,7	5,9	5,4	$5,3 \pm 0,3$
DM2+P	6,2	10,9	7,0	$7,5 \pm 1,4$
P	5,2	5,9	5,6	$5,5 \pm 0,3$

C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung.

5.6.3 Body-Mass-Index (BMI)

Der BMI lag bei den Diabetikern mit einem Mittelwert von $31,8 \pm 6,7$ deutlich höher als bei den Vergleichsgruppen, welche ähnliche Werte zeigten (C: $25,8 \pm 3,5$; P: $24,6 \pm 5,9$). Der Maximalwert von 36,3 wurde bei den Diabetikern diagnostiziert, wohingegen die Maximalwerte bei den Parodontitispatienten und Gesunden mit 24,4 und 28,4 deutlich geringer waren (Tabelle 20). Zwischen den Gesunden und den Parodontitispatienten bestanden statistisch keine Unterschiede ($p = 0,597$; t-Test). Die Unterschiede zwischen den Diabetikern und den beiden Vergleichsgruppen waren statistisch eindeutig ($p = 0,028$ und $p = 0,025$) (Abbildung 33).

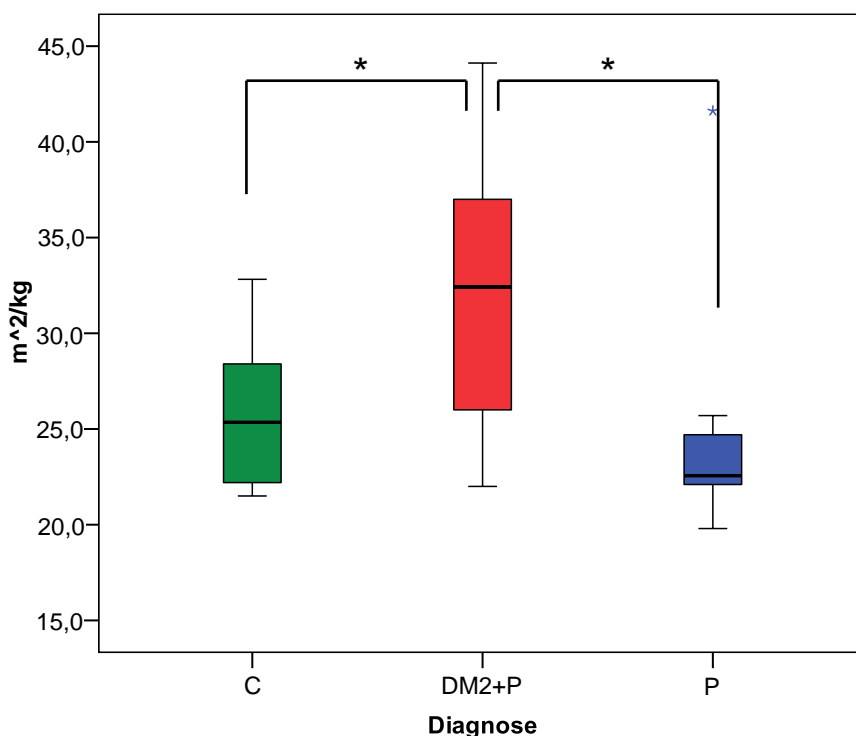


Abbildung 33: Body-Mass-Index (BMI). * = $p < 0,05$; C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten.

Tabelle 20: Deskriptive Statistik des Body-Mass-Index.

Diagnose	Minimum	Maximum	Median	MW \pm SD
C	21,5	28,4	25,5	$25,8 \pm 3,5$
DM2+P	22,0	36,3	32,4	$31,8 \pm 6,7$
P	19,8	24,4	22,6	$24,6 \pm 5,9$

C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung.

5.6.4 C-reaktives Protein (CRP)

Die höchsten Werte wurden bei den Diabetikern gemessen. Der Graubereich (oberer Bereich der Normwerte) von 0,5 – 3,0 mg/l (Katz, 2008) wurde von vier Patienten mit Diabetes (8,80 mg/l, 12,9 mg/l; 4,09 mg/l, 6,82 mg/l), von zwei gesunden Kontrollen (3,82 mg/l und 8,11 mg/l) und einem Parodontitispatienten (3,86 mg/l) überschritten. Bei 17 Studienteilnehmer lag das CRP < 0,05 mg/l und damit unterhalb der Nachweisgrenze. 8 dieser Personen gehörten zur Kontrollgruppe und 6 zu den Parodontitispatienten (Tabelle 21). Die Unterschiede zwischen den Diabetikern und den Parodontitispatienten waren statistisch eindeutig ($p = 0,029$; U-Test). Zwischen den Diabetikern und den Gesunden ($p = 0,218$; U-Test) sowie zwischen den Gesunden und den Parodontitispatienten ($p = 0,436$; U-Test) zeigten sich keine Unterschiede (Abbildung 34).

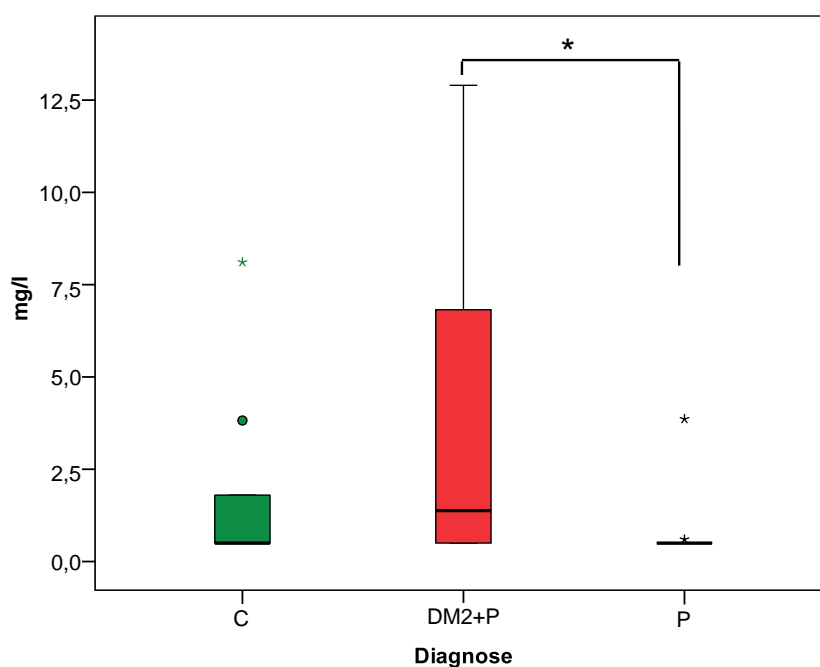


Abbildung 34: C-reaktives Protein. * = $p < 0,05$; C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten.

Tabelle 21: Verteilung der Werte des C-reaktives-Proteins.

Diagnose	< Nachweisgrenze	> Nachweisgrenze	> 3,0 mg/ml
C	8	2	2
DM2+P	3	7	4
P	6	4	1

C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung.

5.6.5 Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG)

Bei drei Studienteilnehmern war eine die BSG erhöht (Referenzwerte nach einer Stunde: unter 50 Jahre > 20 mm für Frauen und > 15 mm für Männer; über 50 Jahre > 30 mm für Frauen und > 20 mm für Männer (Thomas, 2008)). Zwei dieser Personen gehörten der Gruppe der Diabetiker an und eine der Gruppe der Parodontitispatienten (Tabelle 22). Zu beiden Zeitpunkten zeigten die Diabetiker die höchste mediane Blutsenkungsgeschwindigkeit (Median der BSG nach einer Stunde: 8 mm; Median der BSG nach zwei Stunden: 16 mm). Für die statistische Auswertung wurde von einer nicht-parametrischen Verteilung ausgegangen. Die Überprüfung der Strukturgleichheit der drei Diagnosegruppen ergab, dass ein Unterschied zwischen den Gruppen abgelehnt werden kann ($p = 0,213$ für BSG nach 1 Stunde, $p = 0,394$ für BSG nach 2 Stunden, Mediantest). Die grafische Darstellung der BSG ist in Abbildung 35 zusammengefasst.

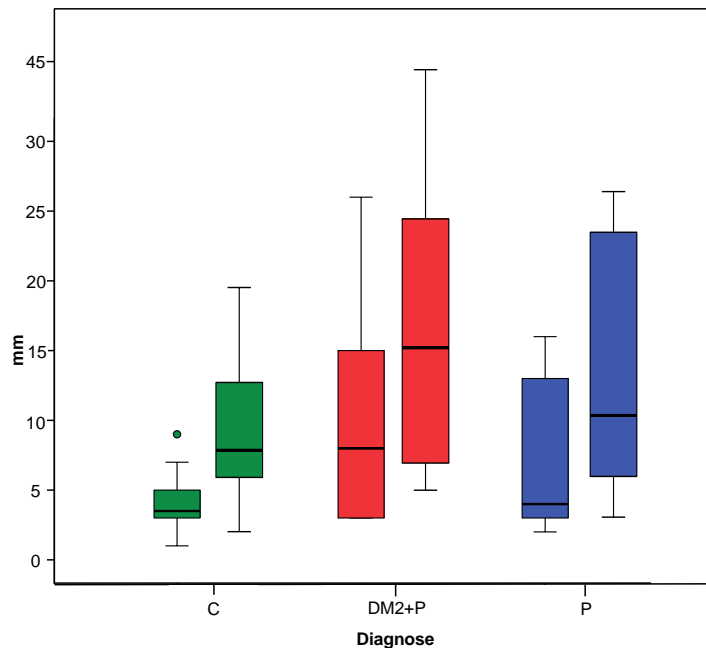


Abbildung 35: Blutsenkung nach 1 und 2 Stunden (mm). C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten.

Tabelle 22: Verteilung der Blutsenkungsgeschwindigkeit oberhalb des Referenzbereiches.

Diagnose	> Referenzbereich BSG
P	0
DM2+P	2
P	0

C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten; BSG: Blutsenkungsgeschwindigkeit.

5.6.6 Anzahl neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut

Der Maximalwert betrug 6,27 giga/l und wurde bei den Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis gemessen. Der minimalste Wert wurde mit 2,13 giga/l bei den Patienten mit Parodontitis festgestellt. Zwischen den Gesunden und den Diabetikern bestand bei der Anzahl der PMN_{PB} mit $3,96 \pm 0,69$ giga/l und $4,01 \pm 1,05$ giga/l kein Unterschied ($p = 0,916$; t-Test). Auch im Mittel wurden bei den Parodontitispatienten die niedrigsten Werte festgestellt ($3,08 \pm 0,82$ giga/l). Der Unterschied zwischen den Gesunden und den Parodontitispatienten war eindeutig ($p = 0,025$; t-Test). Die statistische Auswertung deutet ebenfalls auf einen Unterschied zwischen den Parodontitispatienten und den Patienten mit Diabetes hin ($p = 0,051$) (Abbildung 36 und Tabelle 23).

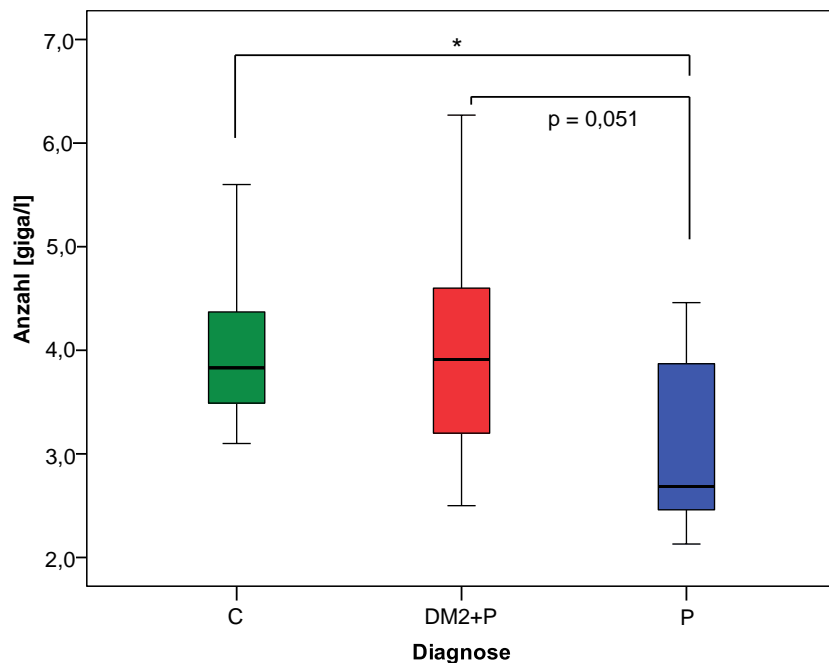


Abbildung 36: Anzahl neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut. * = $p < 0,05$; C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten.

Tabelle 23: Deskriptive Statistik der Anzahl neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut (giga/l).

Diagnose	Minimum	Maximum	Median	MW ± SD
C	3,10	5,60	3,83	3,96 ± 0,69
DM2+P	2,50	6,27	3,91	4,01 ± 1,05
P	2,13	4,46	2,48	3,08 ± 0,82

C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung.

5.7 PMN-Einwanderung und Rezeptorexpression

In der Gruppe der Parodontitispatienten war eine Probe des nicht stimulierten Ansatzes mit Blut kontaminiert und wurde daher nicht in die Auswertung einbezogen.

5.7.1 Anzahl eingewanderter CD45+ Zellen

Zunächst wird die globale (unabhängig von der Diagnosegruppe) Anzahl der bis zum Zeitpunkt 35 Minuten nach inflammatorischer Reizapplikation (stimulierter Ansatz am Testzahn) beziehungsweise Placeboapplikation (nicht stimulierter Ansatz am Kontrollzahn) eingewanderten CD45+ Zellen betrachtet. Die chemotaktische Stimulation führte zu einer eindeutig erhöhten Einwanderung CD45+ Zellen ($p < 0,001$; Vorzeichen-Rang-Test). Im stimulierten Ansatz betrug die Anzahl eingewanderter CD45+ Zellen im Median 10.925 und im nicht stimulierten Ansatz 2.522 (Abbildung 37 und Tabelle 24).

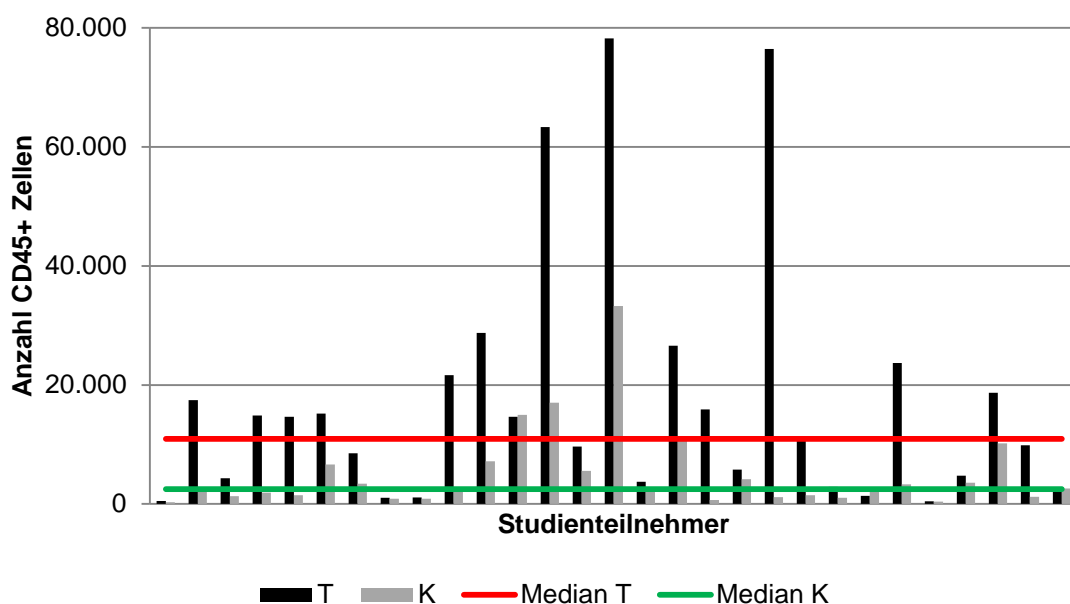


Abbildung 37: Anzahl CD45+ Zellen mit globalem Median für stimulierten und nicht stimulierten Ansatz. T: stimulierter Ansatz; K: nicht stimulierter Ansatz.

Tabelle 24: Deskriptive Statistik der globalen Anzahl CD45+ Zellen im stimulierten und nicht stimulierten Ansatz.

	N	Min	Max	Median	MW \pm SD	Unterschied
T	29	436	78.216	10.925	17.135 \pm 20.949	$p < 0,001$
K	29	285	33.265	2.522	5.010 \pm 6.926	

T: stimulierter Ansatz; K: nicht stimulierter Ansatz; N: Anzahl; Min: Minimalwert; Max: Maximalwert; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung.

Auch die Betrachtung der einzelnen Diagnosegruppen ergab, dass der Median des stimulierten Ansatzes in jeder Gruppe größer als der Median des nicht stimulierten Ansatzes war. Bei den Diabetikern lag der Median im stimulierten Ansatz mit 21.228 Zellen am höchsten. Auch im nicht stimulierten Ansatz war die Zellzahl mit einem Median von 6.349 Zellen in der Gruppe der Patienten mit DM am höchsten. Bei den Parodontitispatienten konnten im Median 4.744 Zellen aus dem Sulcus des Testzahns und 2.520 Zellen aus dem Sulcus des Kontrollzahns gewonnen werden. Im stimulierten Ansatz der Gesunden wurde ein Median von 11.590 CD45+ Zellen und im nicht stimulierten Ansatz von 1.694 CD45+ Zellen ermittelt (Abbildungen 38-39 und Tabelle 25).

Die größten Differenzen eingewanderter CD45+ Zellen und damit die stärkste Reaktion auf den inflammatorischen Reiz, wurden in der Gruppe der Diabetiker beobachtet (Median: 15.363 Zellen). Bei den Parodontitispatienten bildeten die Differenzen einen Median von 1.831 Zellen und bei den Gesunden einen Median von 6.851 Zellen (Abbildung 41 und Tabelle 26). Wechselwirkungen zwischen Diagnose und der Differenz der an Test- und Kontrollzahn eingewanderten Zellen konnten statistisch jedoch nicht eindeutig belegt werden ($p = 0,1334$; Kruskal-Wallis-H-Test und $p = 0,5169$; Mediantest).

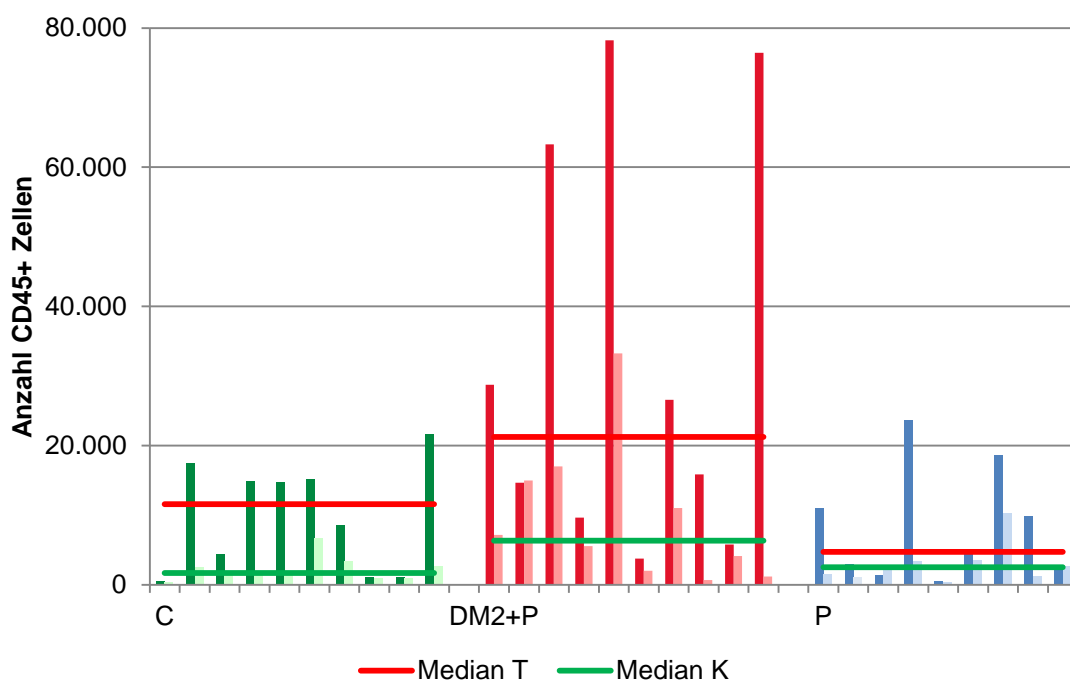


Abbildung 38: Grafische Darstellung der diagnosebezogenen Mediane CD45+ Zellen im stimulierten und nicht stimulierten Ansatz. C: Gesunde (grün); DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis (rot); P: Parodontitispatienten (blau); dunkle Färbung: stimulierter Ansatz; helle Färbung: nicht stimulierter Ansatz; Median T: Median des stimulierten Ansatzes; Median K: Median des nicht stimulierten Ansatzes.

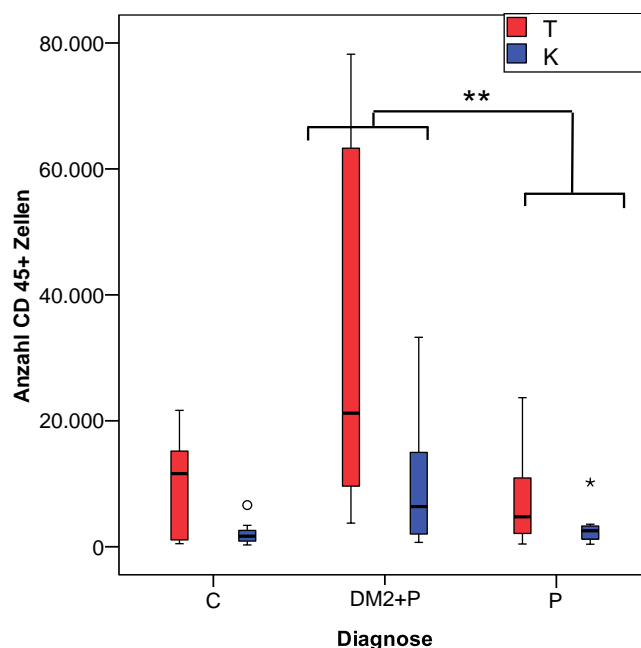


Abbildung 39: Gruppenvergleich der Anzahl CD45+ Zellen der stimulierten und nicht stimulierten Ansätze (Boxplot- Darstellung). T: stimulierter Ansatz; K: nicht stimulierter Ansatz; **= statistisch eindeutiger Unterschied (Kruskal-Wallis-H-Test); C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten.

Tabelle 25: Diagnosebezogene deskriptive Statistik eingewandelter CD45+ Zellen.

	N	Min	Max	Median	MW \pm SD
<i>C</i>					
T	10	488	21.659	11.590	9.933 \pm 7.807
K	10	285	6.618	1.694	2.191 \pm 1.817
<i>DM2+P</i>					
T	10	3.754	78.216	21.228	32.294 \pm 29.203
K	10	692	33.265	6.349	9.701 \pm 10.033
<i>P</i>					
T	9	436	23.675	4.744	8.294 \pm 8.241
K	9	406	10.214	2.520	2.930 \pm 2.933

T: stimulierter Ansatz; K: nicht stimulierter Ansatz; N: Anzahl; Min: Minimalwert; Max: Maximalwert; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten.

Der größte mediane Wert für die Summe von stimulierten und nicht stimulierten Ansatz wurde bei den Diabetikern mit Parodontitis festgestellt (32.751 CD45+ Zellen),

gefolgt von den Gesunden mit median 14.020 CD45+ Zellen und den Parodontitispatienten mit median 8.323 CD45+ Zellen (Abbildung 40 und Tabelle 26). Die Überprüfung eines Unterschieds zwischen den drei Diagnosegruppen bezüglich der Summen von stimulierten und nicht stimulierten Ansatz ergab einen p-Wert von 0,0192 (Kruskal-Wallis-H-Test). Der entsprechende Anschlussstest zeigte einen statistisch eindeutigen Unterschied zwischen der Gruppe der Diabetiker mit Parodontitis und den Parodontitispatienten auf (Abbildungen 39-40 und Tabelle 33, Anhang B).

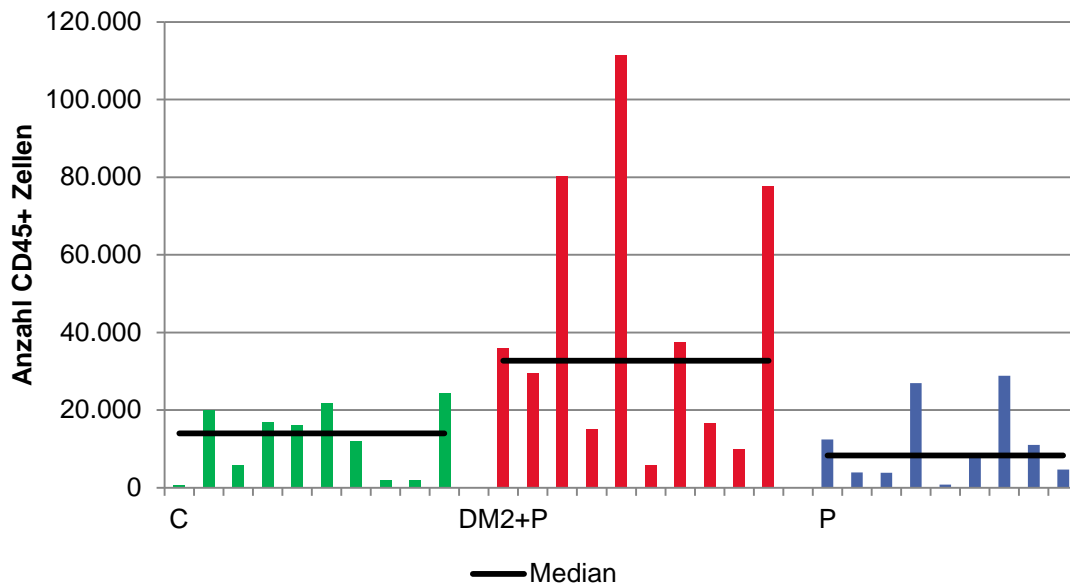


Abbildung 40: Summen der CD45+ Zellen von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen. C: Gesunde (grün); DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis (rot); P: Parodontitispatienten (blau).

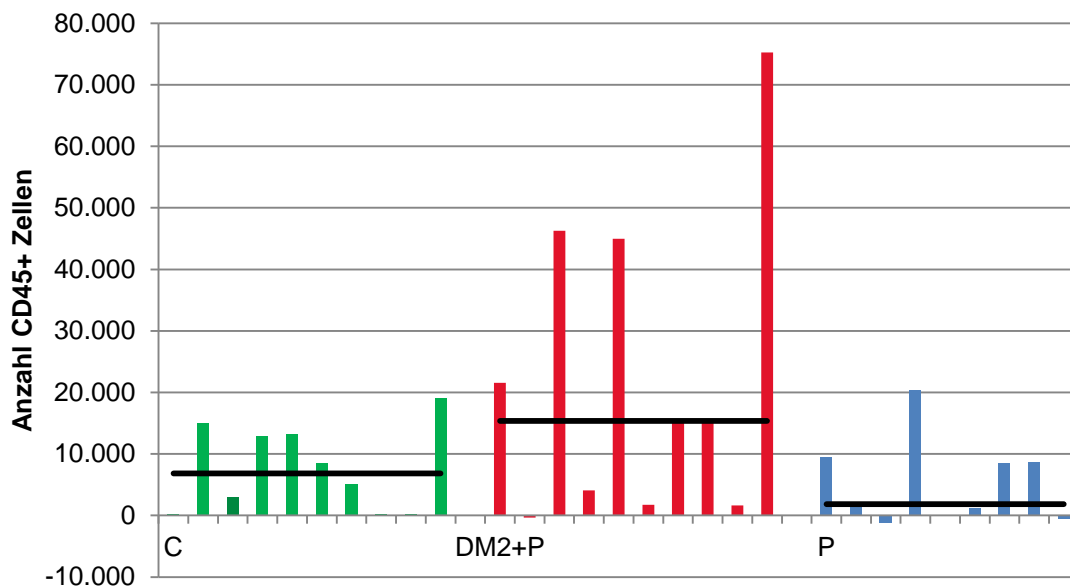


Abbildung 41: Differenzen der CD45+ Zellen von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen. C: Gesunde (grün); DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis (rot); P: Parodontitispatienten (blau).

Tabelle 26: Deskriptive Statistik der Summen und Differenzen CD45+ Zellen von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen.

	N	Min	Max	Median	MW ± SD
<i>Gesamt</i>					
T - K	29	-1.167	75.268	8.445	12.125 ± 17.133
T + K	29	773	111.481	15.167	22.145 ± 26.078
<i>C</i>					
T - K	10	160	19.062	6.851	7.741 ± 6.978
T + K	10	773	24.256	14.020	12.124 ± 8.934
<i>DM2+P</i>					
T - K	10	-339	75.268	15.363	22.592 ± 25.130
T + K	10	5.773	111.481	32.751	41.995 ± 35.714
<i>P</i>					
T - K	9	-1.167	20.379	1.831	5.364 ± 7.052
T + K	9	842	28.873	8.323	11.224 ± 10.164

T – K: Differenz stimulierter minus nicht stimulierter Ansatz; T + K: Summe stimulierter plus nicht stimulierter Ansatz; N: Anzahl; Min: Minimalwert; Max: Maximalwert; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung. . C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten.

5.7.2 Oberflächenexpression CD11b

Global betrachtet (unabhängig von der Diagnosegruppe) führte die chemotaktische Stimulation zu einer eindeutig erhöhten CD11b Expression ($p = 0,0161$; Vorzeichen-Rang-Test). Im stimulierten Ansatz betrug die mediane Fluoreszenz des CD11b Antikörpers (APC) 122 und im nicht stimulierten Ansatz 97 (Abbildung 42 und Tabelle 27).

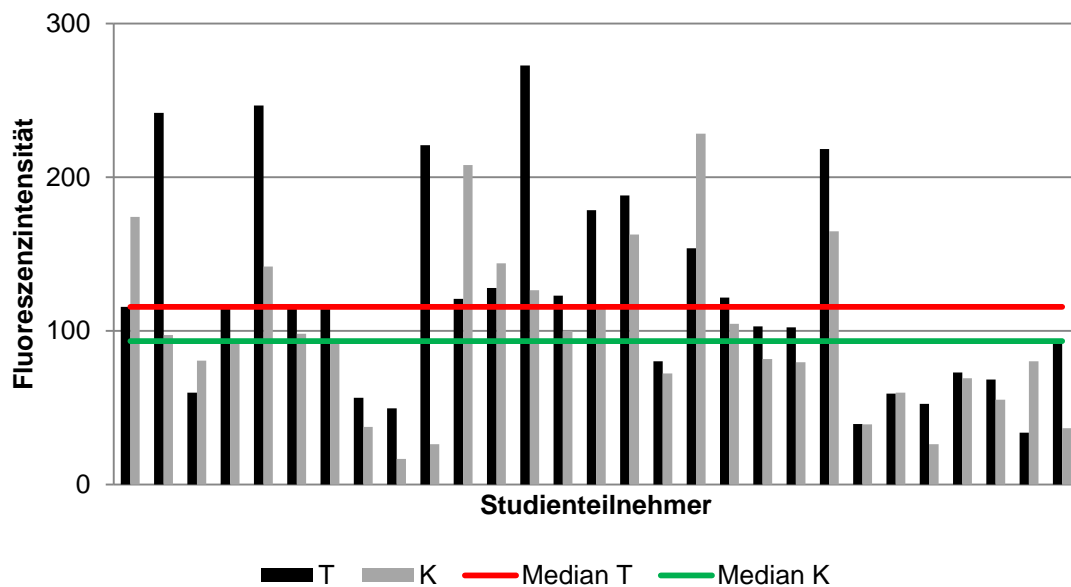


Abbildung 42: Fluoreszenzen (anti CD11b-APC) mit globalem Median für stimulierten und nicht stimulierten Ansatz. T: stimulierter Ansatz; K: nicht stimulierter Ansatz.

Tabelle 27: Deskriptive Statistik der globalen Fluoreszenz (anti CD11b-APC) im stimulierten und nicht stimulierten Ansatz.

	N	Min	Max	Median	MW \pm SD	Unterschied
T	29	34	273	122	122 \pm 67	p = 0,0161
K	29	17	228	97	97 \pm 54	

T: stimulierter Ansatz; K: nicht stimulierter Ansatz; N: Anzahl; Min: Minimalwert; Max: Maximalwert; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung.

Auch für die einzelnen Diagnosegruppen ließ sich für die PMN_{SF} feststellen, dass der Median der Fluoreszenzen im stimulierten Ansatz höher lag als im nicht stimulierten Ansatz. Die mediane Fluoreszenz der PMN_{SF} lag bei den Diabetikern im stimulierten Ansatz mit 125 am höchsten. Im nicht stimulierten Ansatz war der Median mit 120 bei den Diabetikern ebenfalls am höchsten. Der Median betrug bei den Parodontitispatienten 68 im stimulierten Ansatz und 60 im nicht stimulierten Ansatz. In stimulierten Ansatz der Gesunden wurde eine mediane Fluoreszenz von 116 gemessen und im nicht stimulierten Ansatz von 94 (Abbildung 43-44).

Die größten Differenzen zwischen stimulierten und nicht stimulierten Ansatz wurden bei den Gesunden beobachtet (Median 21). Bei den Parodontitispatienten bildeten die Differenzen einen Median von 13 und bei den Diabetikern einen Median von 19 (Abbildung 46 und Tabelle 29). Wechselwirkungen zwischen Diagnose und der Differenz der an Test- und Kontrollzahn gemessenen Fluoreszenzen lagen nicht vor ($p = 0,6286$; Kruskal-Wallis-H-Test und $p = 0,9636$; Mediantest).

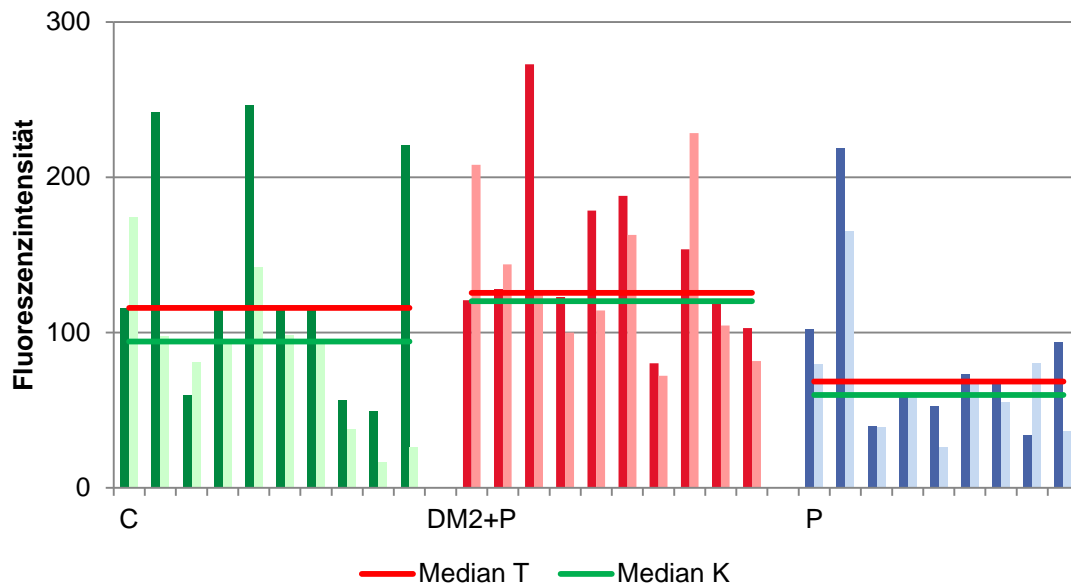


Abbildung 43: Grafische Darstellung der diagnosebezogenen medianen Fluoreszenzen (anti-CD11b APC). C: Gesunde (grün); DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis (rot); P: Parodontitispatienten (blau); dunkle Färbung: stimulierter Ansatz; helle Färbung: nicht stimulierter Ansatz; Median T: Median des stimulierten Ansatzes; Median K: Median des nicht stimulierten Ansatzes.

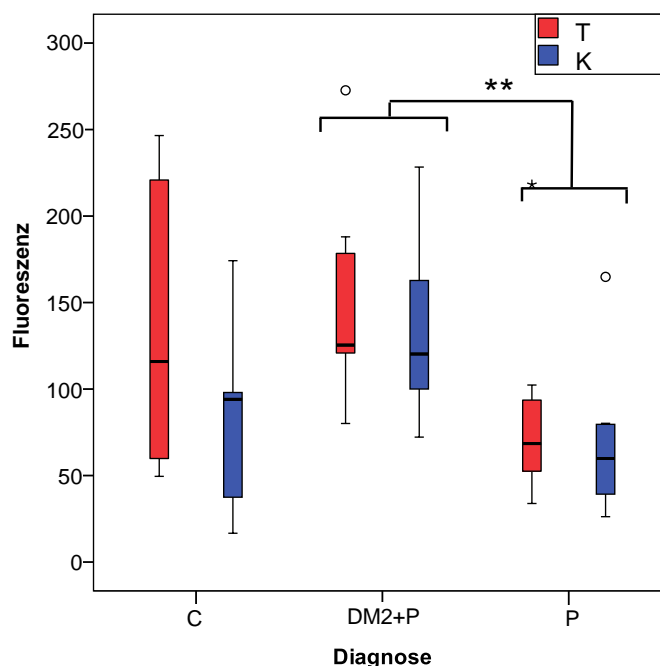


Abbildung 44: Gruppenvergleich der Fluoreszenzen (anti CD11b-APC) von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen (Boxplot-Darstellung). T: stimulierter Ansatz; K: nicht stimulierter Ansatz; **= statistisch eindeutiger Unterschied (Kruskal-Wallis-H-Test); C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten.

Tabelle 28: Diagnosebezogene deskriptive Statistik der Floreszenzen (anti CD11b-APC).

	N	Min	Max	Median	MW ± SD
<i>C</i>					
T	10	50	247	116	134 ± 76
K	10	17	174	94	86 ± 50
<i>DM2+P</i>					
T	10	80	273	125	147 ± 55
K	10	72	228	120	134 ± 52
<i>P</i>					
T	9	34	218	68	82 ± 56
K	9	26	165	60	68 ± 41

T: stimulierter Ansatz; K: nicht stimulierter Ansatz; N: Anzahl; Min: Minimalwert; Max: Maximalwert; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten.

Der größte Median der Summen der Fluoreszenzen von stimulierten und nicht stimulierten Ansatz wurde mit 282 bei den Diabetikern gemessen. Bei den Gesunden lag der Median bei 212 und bei den Parodontitispatienten bei 124 (Abbildung 45 und Ta-

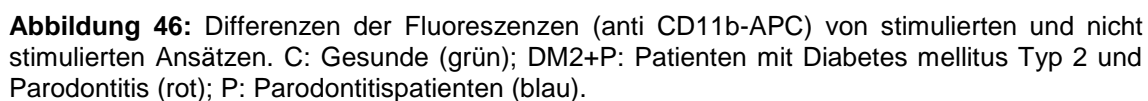
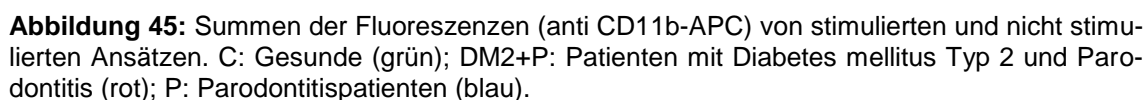


Tabelle 29: Deskriptive Statistik der Summen und Differenzen der Fluoreszenzen (anti CD11b-APC) von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen.

	N	Min	Max	Median	MW ± SD
<i>Gesamt</i>			C		
T - K	29	-87	195	19	25 ± 62
T + K	29	66	399	209	219 ± 105
<i>C</i>					
T - K	10	-59	195	21	48 ± 77
T + K	10	66	388	212	220 ± 102
<i>DM2+P</i>					
T - K	10	-87	146	19	13 ± 66
T + K	10	152	399	282	281 ± 84
<i>P</i>					
T - K	9	-46	57	13	14 ± 31
T + K	9	79	383	124	150 ± 93

T – K: Differenz stimulierter minus nicht stimulierter Ansatz; T + K: Summe stimulierter plus nicht stimulierter Ansatz; N: Anzahl; Min: Minimalwert; Max: Maximalwert; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten.

5.7.3 Oberflächenexpression CD15

Global betrachtet (unabhängig von der Diagnosegruppe) führte die chemotaktische Stimulation zu einer eindeutig erhöhten CD15 Expression ($p = 0,0379$; Vorzeichen-Rang-Test). Im stimulierten Ansatz betrug die mediane Fluoreszenz des CD15 Antikörpers (FITC) 215 und im nicht stimulierten Ansatz 165 (Abbildung 47 und Tabelle 30).

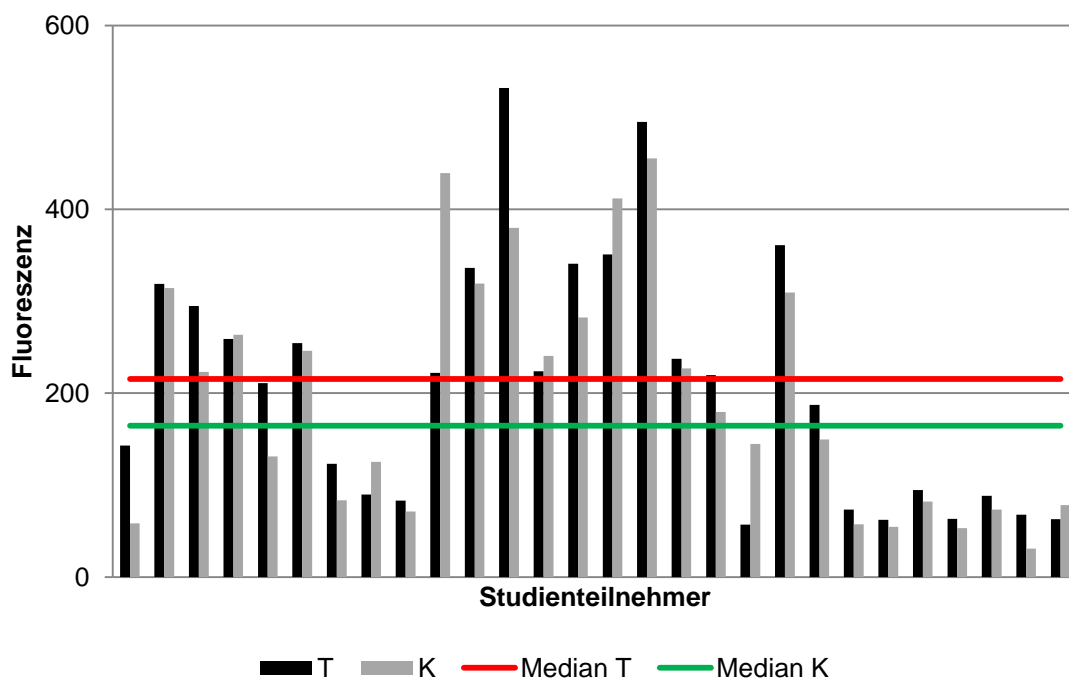


Abbildung 47: Fluoreszenzen (anti CD15-FITC) mit globalem Median für stimulierten und nicht stimulierten Ansatz. T: stimulierter Ansatz; K: nicht stimulierter Ansatz.

Tabelle 30: Deskriptive Statistik der globalen Fluoreszenz (anti CD15-FITC) im stimulierten und nicht stimulierten Ansatz.

	N	Min	Max	Median	MW \pm SD	Unterschied
T	28	57	532	215	209 \pm 134	p = 0,0379
K	28	31	455	165	196 \pm 143	

T: stimulierter Ansatz; K: nicht stimulierter Ansatz; N: Anzahl; Min: Minimalwert; Max: Maximalwert; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung.

In Bezug auf die einzelnen Diagnosegruppen zeigte sich für die Mediane der Fluoreszenzen (FITC) der PMN_{SF} aus den stimulierten und nicht stimulierten Ansätze kein einheitliches Bild. Die Fluoreszenz lag bei Diabetikern im stimulierten Ansatz mit einem Median von 287 geringfügig niedriger als die im nicht stimulierten Ansatz (Median: 301). Im Vergleich zu den anderen Diagnosegruppen waren dies in beiden Fällen die

höchsten Mediane. Die Mediane der Fluoreszenzen der PMN_{SF} bei den Parodontitispatienten wiesen mit einem Wert von 74 an beiden Zähnen keinen Unterschied auf. Im stimulierten Ansatz der Gesunden betrug der Median der Fluoreszenzen der PMN_{SF} 211 und die Fluoreszenzen der PMN_{SF} aus dem nicht stimulierten Ansatz hatten einen Median von 131 (Abbildung 48 und Tabelle 31).

Der Median der Differenzen der Fluoreszenzen von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen lag bei allen Gruppen in einem ähnlichen Bereich. Er betrug bei den Diabetikern 14, bei den Parodontitispatienten 15 und bei den Gesunden 12 (Abbildung 51 und Tabelle 32). Wechselwirkungen zwischen Diagnose und stimulierten beziehungsweise nicht stimulierten Ansatz lagen nicht vor ($p = 0,8352$; Kruskal-Wallis-H-Test und $p = 0,8984$; Mediantest).

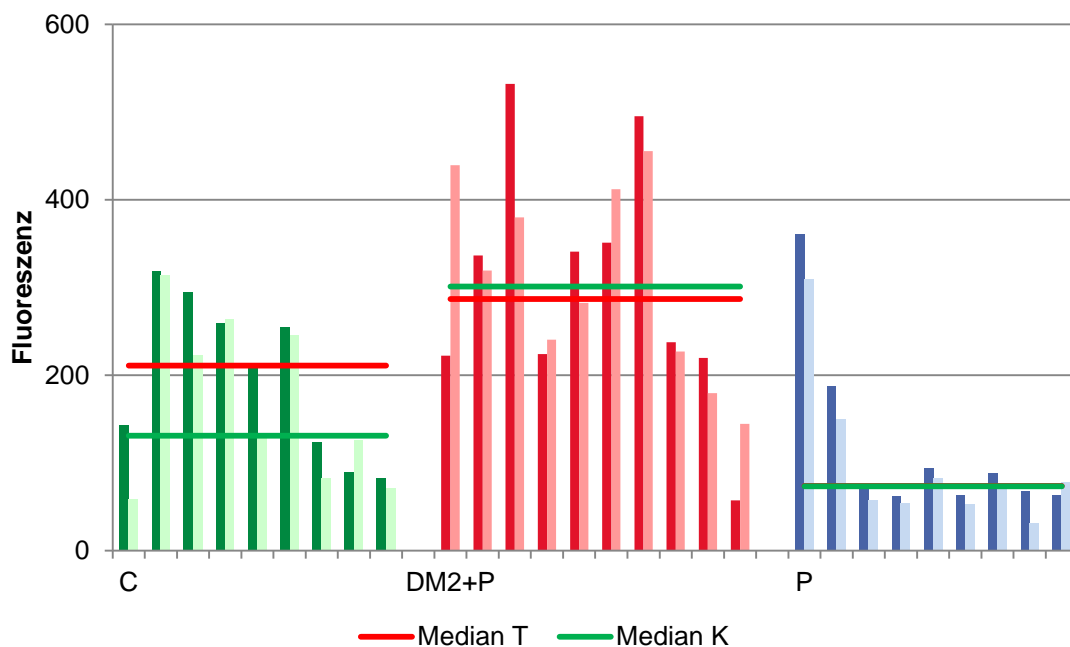


Abbildung 48: Grafische Darstellung der diagnosebezogenen Mediane der an den PMN_{SF} von Test- und Kontrollzahn gemessenen Fluoreszenzen (anti-CD15 FITC). C: Gesunde (grün); DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis (rot); P: Parodontitispatienten (blau); dunkle Färbung: stimulierter Ansatz; helle Färbung: nicht stimulierter Ansatz; Median T: Median des stimulierten Ansatzes; Median K: Median des nicht stimulierten Ansatzes.

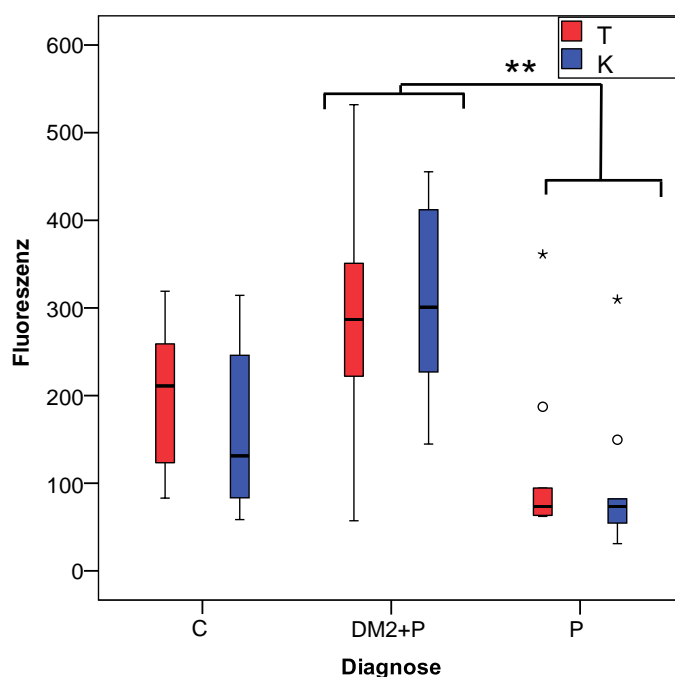


Abbildung 49: Gruppenvergleich der Fluoreszenzen (anti CD15-FITC) von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen (Boxplot-Darstellung). T: stimulierter Ansatz; K: nicht stimulierter Ansatz; **= statistisch eindeutiger Unterschied (Kruskal-Wallis-H-Test); C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten.

Tabelle 31: Diagnosebezogene deskriptive Statistik der Floreszenzen (anti CD15-APC).

	N	Min	Max	Median	MW ± SD
<i>C</i>					
T	10	83	319	211	197 ± 90
K	10	58	314	131	169 ± 94
<i>DM2+P</i>					
T	10	57	532	287	302 ± 141
K	10	145	455	301	308 ± 111
<i>P</i>					
T	9	62	361	74	118 ± 99
K	9	31	310	74	99 ± 86

T: stimulierter Ansatz; K: nicht stimulierter Ansatz; N: Anzahl; Min: Minimalwert; Max: Maximalwert; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; T: stimulierter Ansatz; K: nicht stimulierter Ansatz; C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten.

Die größten Summenwerte der Fluoreszenzen der PMN_{SF} aus den stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen wurde mit einem Median von 640 bei den Patienten mit DM und Parodontitis gemessen. Bei den Gesunden lag der Median der Summen bei einer Fluoreszenz von 342 und bei den Parodontitispatienten von 141 (Abbildung 50 und Tabelle 32). Die Überprüfung dieses Unterschieds zwischen den drei Diagnosegruppen ergab einen p-Wert von 0,0024 (Kruskal-Wallis-H-Test). Der entsprechende Anschluss-test zeigte einen statistisch eindeutigen Unterschied zwischen der Gruppe der Diabetiker mit Parodontitis und den Parodontitispatienten auf (Abbildungen 49-50 und Tabelle 35, Anhang D).

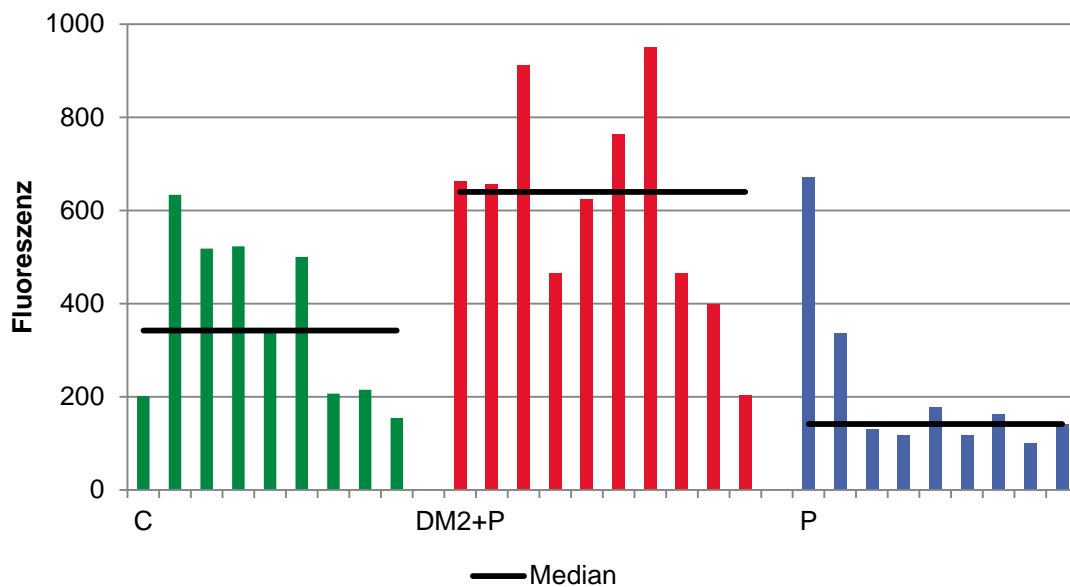


Abbildung 50: Summen der Fluoreszenzen (anti CD15-FITC) von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen. C: Gesunde (grün); DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis (rot); P: Parodontitispatienten (blau).

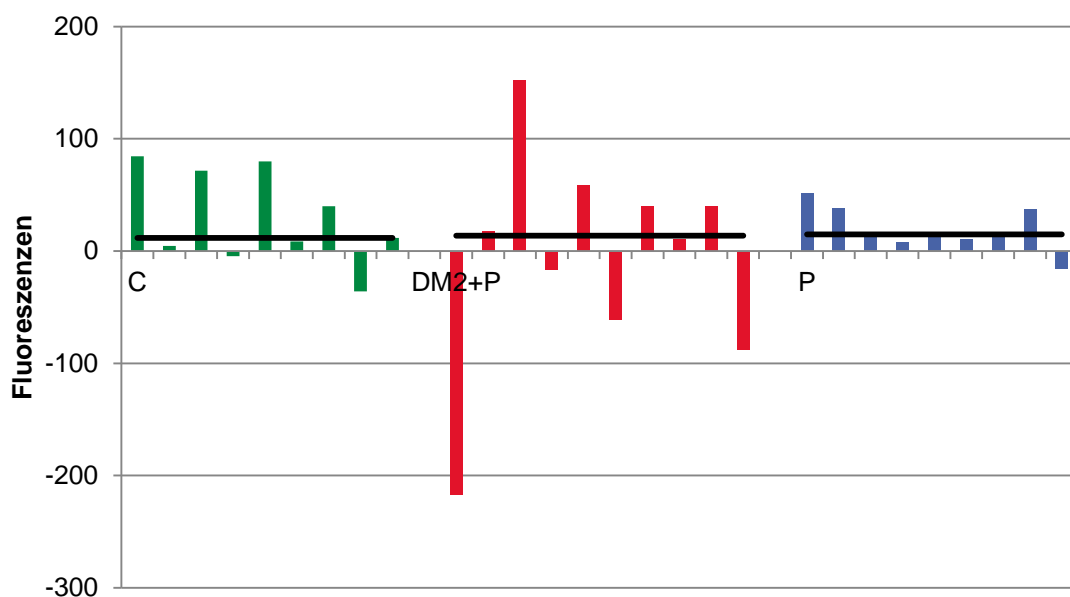


Abbildung 51: Differenzen der Fluoreszenzen (anti CD15-FITC) von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen. C: Gesunde (grün); DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis (rot); P: Parodontitispatienten (blau).

Tabelle 32: Deskriptive Statistik der Summen und Differenzen der Fluoreszenzen (anti CD15-FITC) von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen.

	N	Min	Max	Median	MW ± SD
<i>Gesamt</i>					
			C		
T - K	28	-217	152	14	13 ± 65
T + K	28	99	950	371	405 ± 256
<i>C</i>					
T - K	9	-36	84	12	29 ± 42
T + K	9	154	633	342	366 ± 180
<i>DM2+P</i>					
T - K	10	-217	152	14	-6 ± 99
T + K	10	202	950	640	610 ± 233
<i>P</i>					
T - K	9	-16	52	15	19 ± 20
T + K	9	99	671	141	217 ± 185

T – K: Differenz stimulierter minus nicht stimulierter Ansatz; T + K: Summe stimulierter plus nicht stimulierter Ansatz; N: Anzahl; Min: Minimalwert; Max: Maximalwert; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung. C: Gesunde; DM2+P: Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis; P: Parodontitispatienten.

6. Diskussion

6.1 Methodendiskussion

6.1.1 Mundhygienephase

Durch die 14-tägige Mundhygienephase sollte ein Einfluss gingivaler Entzündung auf die Ergebnisse des Hauptversuches ausgeschlossen werden. Das Erfassen der Mundhygieneindizes PBI und PLI diente dabei nicht nur zur Überprüfung der Mitarbeit des Patienten, sondern auch zu dessen Motivation. Besonders durch das Anfärben der Plaque können dem Patienten beziehungsweise Probanden individuelle Schwachstellen visuell aufgezeigt werden. Eine ausführliche Diskussion der Ergebnisse der Mundhygienephase erfolgt in Kapitel 6.2.5.

6.1.2 Chemotaxistests

Bei den meisten etablierten Methoden zur Testung der Chemotaxis von humanen Immunzellen handelt es sich um Verfahren, die *in vitro* an isolierten Zellen des peripheren Blutes durchgeführt werden. Zu diesen Verfahren gehören die Boyden-Kammer (Boyden, 1962) und ihre Modifikationen (Meyle & Axmann-Krcmar, 1999; Zigmond, 1977; Zigmond & Hirsch, 1973) sowie die Testung der Chemotaxis in Agarose-Gel (Nelson et al., 1975). Bei diesen Methoden ist eine Blutentnahme und die zeitaufwendige Isolation der interessierenden Zellen notwendig. Zudem repräsentiert das Ergebnis der Chemotaxistestung nicht eine lokale Situation, sondern die der Zellen im peripheren Blut. Die von REBUCK (1955) entwickelte Hautfenstertechnik, bei der künstliche Läsionen auf der Haut geschaffen werden, gibt zwar Aufschluss über die lokale chemotaktische Aktivität der Zellen, ist aber sehr invasiv. Ein nicht invasives *in vivo* Verfahren zur Testung der lokalen Chemotaxis im *Sulcus gingivae* etablierte GOLUB (GOLUB ET AL., 1981). Bei diesem Chemotaxistest wird der Sulcus nach Reizapplikation in 5-minütigen Abständen nach der Methode von SKAPSKI UND LEHNER (Skapski & Lehner, 1976) zur Zellgewinnung ausgespült. MEYLE entwickelte 1986 ein neues Verfahren zur Granulozytengewinnung, welches in dieser Studie zur Anwendung kam. Bei dieser Methode sind die Zellen einem geringerem mechanischen Stress ausgesetzt, da sie nicht mehrfach in eine Spritze reaspiert werden, sondern nur einmal abgesaugt werden und dann direkt auf Eis gelagert werden. Entsprechend zeigen nach der Methode von MEYLE gewonnen PMN_{SF} eindeutig längere Überlebensdauern als PMN_{SF} , die nach der Methode von SKAPSKI UND LEHNER gewonnen wurden (Meyle, 1986). Weiterhin ist die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit der Methode nach

SKAPSKI UND LEHNER nur schwer zu erreichen (Lütke-meier, 1995) und der mechanische Stress, welchem die Zellen bei dieser Methode ausgesetzt werden, kann zu Veränderungen der Zelloberfläche führen. Aufgrund der Nachteile dieser Methode wurde für die eigenen Untersuchungen das Verfahren nach MEYLE gewählt.

6.1.3 Sulcusflüssigkeits-Fließrate

In dieser Studie betrug die Verweildauer des Filterpapierstreifens (Periopaper®) 30 Sekunden. Eine mögliche Fehlerquelle bei diesem Verfahren stellt die Kontaminierung mit Speichel dar (Griffiths, Wilton, et al., 1992). Um dies zu vermeiden, wurden die Zähne an denen die SFFR bestimmt wurde mit Watterollen trockengelegt und mit leichten Luftpüsterstößen 2 Sekunden von mesial und distal getrocknet. Der Zutritt von frischem Speichel wurde durch die Watterollen und Absaugen verhindert. Mit Blut kontaminierte Streifen wurden verworfen. Aufgrund der sehr geringen Volumina können die Ergebnisse der Volumenbestimmung durch Evaporation beeinflusst werden. Hierbei handelt es sich jedoch um einen systematischen Fehler, der alle Proben gleichermaßen betrifft und somit zu vernachlässigen ist. Die Volumenbestimmung erfolgte mit einem kalibrierten Periotron 8000. Dieses Gerät ist speziell auf die Messung der kleinen Volumina von SF ausgelegt und besitzt eine hohe Reliabilität mit der reproduzierbare Ergebnisse erreicht werden können (Ciantar & Caruana, 1998). Die SFFR kann durch mechanische Irritation wie Kauen (N. Brill, 1959a) Plaqueentfernung, Einführen eines Filterpapierstreifens oder Luftpüsterstöße beeinflusst werden (Cimasoni, 1983). Die Plaqueentfernung vor dem Einführen des Filterpapierstreifens ist notwendig, um diese nicht mit dem Streifen aufzunehmen. Eine Kontamination mit Plaque würde, ebenso wie Speichel oder Blut, die Periotron-Werte verfälschen. Um die mechanische Irritation der Gingiva so gering wie möglich zu halten, erfolgte die Plaqueentfernung mit dem Scaler so vorsichtig wie möglich. Des Weiteren wurde der Filterpapierstreifen standardisiert 1 mm in die Sulci eingeführt. Bei dieser Methode ist zum einen die mechanische Irritation gering und zum anderen wird durch diese Standardisierung eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Patienten beziehungsweise Probanden erreicht.

6.1.4 Durchflusszytometrie

Das Verfahren der Durchflusszytometrie ist das heute gebräuchliche Instrument zur Zellzählung und –differenzierung. In der HIV-Diagnostik und Therapieüberwachung wird es ebenso wie in der Tumordiagnostik routinemäßig eingesetzt.

In den Vorversuchen konnte mit dem Durchflusszytometer für die Bestimmung der Anzahl von PMN_{PB} und PMN_{SF} mit Hilfe von CytoCount™-Suspension eine gute Reproduzierbarkeit der Messungen festgestellt werden. Im Gegensatz zur Zellzählung beziehungsweise Zelldifferenzierung mit einem Lichtmikroskop, wie es GOLUB (1981; 1982) und IACONO (1985) in ihren Studien für die Zählung von PMN_{SF} anwendeten, werden Zähl- oder Übertragungsfehler bei einer maschinellen Zählung vermieden. Aufgrund der wesentlich größeren Anzahl ausgezählter Ereignisse (in dieser Studie 5000) ist das Ergebnis zudem genauer. Eine weitere potentielle Fehlerquelle bei der Bestimmung der Oberflächenexpression mit Antikörperfärbung besteht in der Überlagerung von Emissionsspektren einzelner Fluorochrome. In dieser Studie wurden die Farbmarker so ausgewählt, dass sich ihre Emissionsspektren nicht überlappten und die Oberflächenrezeptormarkierung in 4 parallelen Ansätzen vorgenommen. Auf eine optionale Fluoreszenzkomensation konnte somit verzichtet werden.

6.2 Ergebnisdiskussion

6.2.1 Blutglukose und HbA1c

Erwartungsgemäß zeigten die Diabetiker mit einem medianen Plasma-Glukose-Wert von 153 mg/dl und einem medianen HbA1c von 7,0 % deutlich erhöhte Werte und sind damit nach den Kriterien der ADA (2010) eindeutig als Diabetiker zu identifizieren. In den beiden anderen Studiengruppen konnte kein Teilnehmer identifiziert werden, dessen Werte nach den Kriterien der ADA (2010) für das Vorliegen eines DM gesprochen hätten ($HbA1c \geq 6,5 \%$, Nüchtern-Plasmaglukosewert von ≥ 126 mg/dl).

Die in der vorliegenden Studie festgestellten Schwankungen des HbA1c-Wertes innerhalb der Gruppe der Diabetiker (6,2 %-10,9 %) fallen im Literaturvergleich ähnlich aus (Delamaire et al., 1997; Karima et al., 2005; Lecube, Pachon, Petriz, Hernandez, & Simo, 2011; Marhoffer, Stein, Maeser, & Federlin, 1992). Für zukünftige Studien wäre eine Stratifizierung der HbA1c-Werte denkbar.

Eine Schwierigkeit der hier vorgestellten Studie bestand in der Rekrutierung von Patienten mit DM Typ 2, welche die parodontalen Einschlusskriterien erfüllten ($ST \leq 3$ mm an den zur Probenentnahme herangezogenen Zähnen). Aufgrund des bidirektionalen

Zusammenhangs von DM und Parodontitis (Deschner et al., 2011; Lalla & Papapanou, 2011; Mealey & Rethman, 2003) waren die parodontalen Befunde bei den Diabetikern oft zu schwer und führten zum Studienausschluss. Besonders häufig war dies bei Diabetikern mit einem ungenügend kontrollierten oder bis *dato* unbehandelten Diabetes der Fall. Dieser, bei der Rekrutierung der Studienteilnehmer beobachtete Zusammenhang zwischen einem hohen HbA1c-Wert und dem Schweregrad der Parodontitis, ist durch zahlreiche Studien belegt (Bandyopadhyay, Marlow, Fernandes, & Leite, 2010; Lalla et al., 2007).

6.2.2 Hämatologie

DM Typ 2 ist mit erhöhten Konzentrationen zirkulierender Akute-Phase-Proteine, wie beispielsweise CRP (Katagiri et al., 2009; McMillan, 1989), Haptoglobin (McMillan, 1989), Fibrinogen (Barillari, Fabbro, Pasca, & Bigotto, 2009) und Serum Amyloid A (Pickup, Mattock, Chusney, & Burt, 1997) assoziiert. Ebenso sind die Konzentrationen von TNF- α (Spranger et al., 2003), IL-1 β und IL-6 (Pickup et al., 1997; Spranger et al., 2003), welche die CRP-Produktion in der Leber induzieren, bei Diabetikern deutlich erhöht. Auch in der hier vorgestellten Studie fallen die höheren CRP-Werte der Patienten mit DM Typ 2 im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen auf, obwohl bei den Diabetikern mit Parodontitis und den Parodontitispatienten eine klinisch vergleichbare parodontale Erkrankungsschwere bestand. Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass die CRP-Werte bei Parodontitispatienten im Vergleich zu Gesunden erhöht sind und mit dem Schweregrad der parodontalen Erkrankung, ausgedrückt durch den Verlust an klinischem Attachment und alveolärem Knochen, korrelieren (Kanaparthi, Kanaparthi, & Niranjani, 2012; Noack et al., 2001; Saito et al., 2003). Die konservative Parodontitis-therapie mit mechanischer Entfernung aller supra- und subgingivalen Beläge führt ebenso wie die Extraktion parodontal erkrankter Zähne zu einer eindeutigen Senkung der CRP-Werte (D'Aiuto et al., 2004; Marcaccini et al., 2009; B. A. Taylor et al., 2006). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der diskutierten Studien bestanden in der vorliegenden Studie keine Unterschiede zwischen den Parodontitispatienten und den Gesunden. Bei den Parodontitispatienten lagen jedoch 2 Personen weniger unterhalb der Nachweisgrenze des CRP (CRP < 0,5 mg/l) als bei den Gesunden.

Die Anzahl der PMN_{pb} lag bei allen Studienteilnehmern innerhalb des Referenzbereiches von 1,8 – 7,7 giga/l (Katz, 2008). In verschiedenen Studien konnte bei Diabetikern eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut nachgewiesen wer-

den, was einen Einfluss auf die Ergebnisse der PMN_{SF} -Einwanderung haben könnte. Dieser mögliche Zusammenhang wird in Kapitel 6.2.7 diskutiert.

6.2.3 Body-Mass-Index

Der BMI lag bei den Diabetikern mit einem Median von 31,8 im adipösen Bereich. Die gesunden Kontrollen und die Parodontitispatienten zeigten ähnliche Werte innerhalb des physiologischen Normbereichs (WHO, 2000). Der Zusammenhang zwischen Übergewicht beziehungsweise Adipositas und erhöhtem Diabetesrisiko ist wissenschaftlich fundiert (ADA, 2010). Eine aktuelle Metaanalyse über den Zusammenhang zwischen Übergewicht beziehungsweise Adipositas und Parodontitis ergab für beide Parameter mit einer Odds-Ratio von 1,27 für Übergewicht und 1,81 für Adipositas, sowie 2,13 für Adipositas und Übergewicht eine eindeutige Assoziation (Suvan, D'Aiuto, Moles, Petrie, & Donos, 2011). Als ein möglicher Pathomechanismus in diesem Zusammenhang gilt die Produktion proinflammatorischer Botenstoffe wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α durch Adipozyten. Bei übergewichtigen Patienten mit einem übermäßigen Konsum von Nährstoffen nimmt, zusammen mit dem BMI, auch der Anteil des Fettgewebes und damit die Menge der in den Blutkreislauf gelangenden Entzündungsmediatoren zu. Durch die besonders lokal im Fettgewebe erhöhten proinflammatorischen Zytokine werden Monozyten rekrutiert, welche in das Fettgewebe einwandern und zu Makrophagen werden (Donath & Shoelson, 2011). Unter dem Einfluss von IL-1 β und anderen Entzündungsmediatoren, die von Adipozyten ausgeschüttet werden, differenzieren sich die Makrophagen in den sogenannten M1-Phänotyp (klassische Aktivierung). Neben Antigenpräsentation und Phagozytose haben die M1-Makrophagen die Funktion weitere proinflammatorische Zytokine und Mediatoren wie TNF- α , IL-6 und Stickstoffmonoxid (NO) zu produzieren und auszuschütten (Van Ginderachter et al., 2006). Dadurch kommt es zu Rekrutierung weiterer Entzündungszellen und einen weiteren Anstieg proinflammatorischer Zytokine sowie Akute-Phase-Proteine im Blut. Entsprechend wurde in aktuellen Studien eine positive Korrelation des Körpergewichts mit dem CRP und anderer im Blut nachweisbaren Entzündungsparameter festgestellt (Visser, Bouter, McQuillan, Wener, & Harris, 1999).

6.2.4 Schweregrad der parodontalen Erkrankung

Die mittlere Anzahl der Zähne war bei den beiden Gruppen mit Parodontitis mit 25 Zähnen gleich (DM2+P: $25,4 \pm 2,8$ Zähne; P: $25 \pm 4,1$ Zähne). Im Vergleich dazu lag die mittlere Zahnzahl bei den Gesunden mit $27,8 \pm 2,7$ im Bereich eines komplett bezahnten natürlichen Gebisses. Sowohl die Werte für die mittlere ST_{ges} als auch für das

mittlere CAL zeigen deutlich, dass der Schweregrad der Erkrankung in den beiden Gruppen mit Parodontitis ähnlich war (ST: DM2+P: $2,69 \pm 1,13$ mm und P: $2,50 \pm 1,09$ mm; CAL: DM2+P: $3,02 \pm 1,43$ mm; P: $2,84 \pm 1,29$ mm). Die Werte der Gesunden lagen erwartungsgemäß niedriger (ST_{ges}: $1,86 \pm 0,68$ mm; CAL: $2,06 \pm 0,80$ mm). Diese Ergebnisse belegen, dass zwischen den Parodontitispatienten mit und ohne Diabetes keine Unterschiede im Schweregrad der parodontalen Erkrankung bestanden.

Bei den Gesunden wurde bei $6,3 \pm 9,3$ % aller sondierten Stellen eine Blutung diagnostiziert. Die Parodontitispatienten bluteten an $19,0 \pm 11,1$ % aller Stellen und bei den Diabetikern mit Parodontitis lag der Anteil der blutenden Stellen mit $39,5 \pm 24,2$ % mit Abstand am höchsten. ST, CAL und BOP wurden vor Beginn der Mundhygienephase erhoben um eine Irritation des Gewebes zu vermeiden und die Probenentnahme nicht zu beeinflussen. Eine ausführliche Diskussion der bei den Diabetikern festgestellten erhöhten Blutungsneigung erfolgt im nächsten Kapitel (6.2.5 Mundhygieneindizes).

6.2.5 Mundhygieneindizes

Das Ziel der Mundhygienephase, PBI = 0 an den Test- und Kontrollzähnen, wurde bei allen Studienteilnehmern erreicht. Durch die Maßnahmen der Mundhygienephase konnte der PBI des Gesamtgebisses bei 25 und der PLI bei 27 Studienteilnehmern verbessert werden. Der mediane PLI konnte bei den Gesunden um 0,40-Indexeinheiten gesenkt werden (von 1,15 auf 0,79). Bei den Diabetikern wurde der mediane PLI durch die Mundhygienephase um 0,63 Indexeinheiten (von 2,07 auf 1,34) gesenkt und bei den Parodontitispatienten um 0,59 Indexeinheiten (von 1,44 auf 0,85). Auch die Indexwerte des PBI waren in allen Gruppen nach 14 Tagen deutlich verbessert. Die Gesunden und die Parodontitispatienten verbesserten ihren medianen PBI von 0,09 und 0,16 auf 0. Bei den Parodontitispatienten wurde der mediane PBI von 0,22 um 0,13 Indexeinheiten auf 0,09 gesenkt. Diese Ergebnisse bestätigen die Wirksamkeit der angewandten PZR in Kombination mit Instruktion und Motivation. Die minimalen Verschlechterungen der Indizes, die beim PBI bei einem Gesunden und beim PLI bei zwei Gesunden und einem Parodontitispatienten festgestellt wurden, lassen sich darauf zurückführen, dass diese Personen bereits am Tag -14 eine sehr gute Mundhygiene aufwiesen. Es ist davon auszugehen, dass bei diesen Patienten beziehungsweise Kontrollen keine weitere Verbesserung der Werte zu erzielen war. Die höchsten Indexwerte für PBI und PLI wiesen an beiden Befundungstagen die Patienten mit DM Typ 2 und chronischer Parodontitis auf. Die niedrigsten Werte wurden, wie zu erwarten, bei den parodontal und systemisch Gesunden befundet. Bezüglich des PBI

bestanden am Tag 0 keine Unterschiede. Der Einfluss einer klinisch manifesten gingivalen Entzündung auf die Ergebnisse kann somit ausgeschlossen werden.

Bei Diabetikern gibt es Hinweise auf eine Korrelation zwischen schlechter glykämischer Einstellung (HbA1c-Wert) und erhöhten Plaqueindizes (Commisso, Monami, & Mannucci, 2011). Zudem wurde in einigen Studien zum Mundhygieneverhalten von Diabetikern ein geringeres Interesse dieser Patienten für ihre orale Gesundheit und eine weniger ausgeprägte Compliance dokumentiert, was konsequent zu höheren Plaquewerten führt (Commisso et al., 2011; Thorstensson, Falk, Hugoson, & Kuylenstierna, 1989). Auf die Patienten mit DM, welche an der vorliegenden Studie teilgenommen haben, kann diese Aussage aufgrund des großen Interesses nicht übertragen werden. Kein einziger Patient hat die Studie vorzeitig abgebrochen oder musste aufgrund unzureichender Compliance ausgeschlossen werden.

Höheren PBI und PLI-Werte bei Patienten mit DM wurden auch von anderen Autoren beschrieben. Entsprechend zeigen Diabetiker mit Parodontitis im Vergleich zu systemisch gesunden Parodontitispatienten sowohl vor als auch nach Parodontitistherapie höhere Plaque- (Westfelt, Rylander, Blohme, Jonasson, & Lindhe, 1996) und Papillenblutungs- beziehungsweise Gingivitiswerte (Commisso et al., 2011; Cutler, Machen, Jotwani, & Iacopino, 1999; Westfelt et al., 1996). Ein weiterer Grund für die hohen Plaquewerte der Diabetiker könnte darin bestehen, dass die erhöhte Glucosekonzentration in der SF (Ficara, Levin, Grower, & Kramer, 1975) und eine von verschiedenen Autoren beschriebene erhöhte SFFR (Ringelberg, Dixon, Francis, & Plummer, 1977; Sakallioglu, Lutfioglu, Sakallioglu, Diraman, & Keskiner, 2008) das Plaquewachstum begünstigen. Im Gegensatz zu den oben diskutierten Studien und der vorliegenden Studie, stellten HUGOSON ET AL. (1989) bei Diabetikern im Vergleich zu gesunden Kontrollen zwar eine höhere Gingivitisprävalenz, jedoch keine Unterschiede bezüglich der Plaquewerte fest. Auch in einer experimentellen Gingivitisstudie mit Aussetzen aller Mundhygienemaßnahmen für 3 Wochen konnten zwischen den untersuchten Diabetikern (DM Typ 1) und den gesunden Kontrollen keine Unterschiede in der akkumulierten Plaquemenge festgestellt werden. Bei den Diabetikern zeigte sich nach 7 und 21 Tagen jedoch ein eindeutig höherer Gingival-Index (Salvi et al., 2005).

6.2.6 Sulcusflüssigkeits-Fließrate (SFFR)

Die als Indikator für entzündliche Veränderungen im parodontalen Gewebe geltende SFFR (Del Fabbro et al., 2001; Griffiths, Sterne, et al., 1992; Loe & Holm-Pedersen, 1965) konnte ebenfalls durch die Maßnahmen der Mundhygienephase deutlich reduziert werden. Entsprechend zeigte sich in allen Gruppen eine Abnahme der SFFR/30

Sekunden von Tag -14 zu Tag 0. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf einen Rückgang entzündlicher Vorgänge im gingivalen beziehungsweise parodontalen Gewebe.

Erwartungsgemäß war das SF-Volumen/30 Sekunden am Tag 0 bei den Patienten mit DM am höchsten und bei den gesunden Kontrollen am niedrigsten. Ein Vergleich der Strukturgleichheit ergab jedoch, dass zwischen den einzelnen Gruppen keine Unterschiede bestanden. SAKALLIOGLU ET AL. (2008) beschrieben bei gut eingestellten Diabetikern mit Parodontitis im Vergleich zu systemisch gesunden Parodontitispatienten und gesunden Kontrollen ebenfalls höhere SF-Volumina. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie, wurden in dieser Studie statistisch eindeutige Unterschiede zwischen den drei Studiengruppen (DM2+P, P, C) festgestellt. Dies könnte an der größeren Studienpopulation (DM2+P: $n = 15$; P: $n = 14$; C: $n=14$) sowie an der homogenen glykämischen Einstellung der Diabetiker ($HbA1c \leq 7,0 \%$) liegen. Zudem waren die Einschlusskriterien für die zur SF-Entnahme herangezogenen Zähne in der Studie von SAKALLIOGLU ET AL. ein Attachmentlevel ≥ 5 mm und röntgenologisch erkennbarer Knochenabbau, wohingegen in unserer Untersuchung eine $ST > 4$ mm ein Ausschlusskriterium darstellte. Durch dieses Ausschlusskriterium sollte erreicht werden, dass die Oberfläche an der SF austreten kann, zwischen den einzelnen Studienteilnehmern vergleichbar ist. Auch RINGELBERG ET AL. (1977) stellten bei Kindern mit DM Typ 1 im Vergleich zu systemisch Gesunden eine erhöhte SFFR fest. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis konnten in einer longitudinalen Studie mit Erwachsenen (Navarro-Sanchez, Faria-Almeida, & Bascones-Martinez, 2007) keine Unterschiede festgestellt werden. Verglichen wurde die SFFR von Patienten mit DM Typ 2 und systemisch gesunden Patienten vor und nach Parodontitistherapie. Der Stichprobenumfang war mit $n = 10$ pro Gruppe der gleiche wie in der vorliegenden Studie. Die kontroversen Ergebnisse der diskutierten Studien deuten darauf hin, dass sich mögliche Unterschiede zwischen den SFFR von Diabetikern und Nichtdiabetikern nur mit größeren Stichprobenumfängen und homogenen Studiengruppen belegen lassen.

Da die SFFR zirkadianen Schwankungen unterliegt (Bissada et al., 1967), wurden die Untersuchungen und SF-Entnahmen in der vorliegenden Studie immer zur gleichen Tageszeit (vormittags) durchgeführt. Die Behandlung beziehungsweise Probenentnahme erfolgte nach dem Frühstück und der morgendlichen Medikamenteneinnahme der Diabetiker, um eine erhöhte Insulinpräsenz und damit eine mögliche Hypoglykämie während der durchgeführten Maßnahmen zu vermeiden (Mealey, 1998). Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch zirkadiane Schwankungen kann demnach ausgeschlossen werden.

Der Einfluss weiblicher Sexualhormone auf die SFFR wird ebenfalls kontrovers diskutiert. Einige Autoren bestätigen den Einfluss von Hormonen auf die SFFR (Fessler, 1977; Lindhe et al., 1969; Markou et al., 2009), wohingegen eine große Studie mit 120 Studienteilnehmern zu dem Ergebnis kam, dass das Geschlecht die SFFR nicht beeinflusst (Borden, Golub, & Kleinberg, 1977). An der vorliegenden Studie nahmen vier Frauen teil, die noch einem weiblichen Monatszyklus unterlagen (1 DM2+PA, 3 P). Beeinflussungen durch Kontrazeptiva konnten aufgrund der Anamnese ausgeschlossen werden.

Weitere Einflussfaktoren wie Tabakkonsum (Morozumi et al., 2004) und mechanischer Irritation der Gingiva (N. Brill, 1959a) konnten ebenfalls weitgehend ausgeschlossen werden, da alle Patienten Nichtraucher waren und angewiesen wurden am Tag der Probenentnahme keine Zahnseide zu benutzen. Nach CIMASONI (1974) stellt jedoch bereits die alleinige Entnahme von SF mit einem Filterpapierstreifen oder die Trockenlegung eines Zahnes mit leichten Luftpüsterstößen eine Irritation der Gingiva dar, die zu einer höheren SFFR führen könnte. Da bei allen Studienteilnehmern das beschriebene Protokoll eingehalten wurde, würde es sich bei diesem möglichen Einflussfaktor um einen systematischen Fehler handeln.

6.2.7 PMN-Einwanderung

Die chemotaktische Stimulation führte bei allen bestimmten Parametern zu einem eindeutigen Anstieg (Anzahl PMN: $p < 0,0001$; Oberflächenexpression CD11b: $p = 0,0161$; Oberflächenexpression CD15: $p = 0,0379$). Die inflammatorische Reizapplikation mit Casein führte demnach zu einer chemotaktischen Aktivierung und der damit verbundenen Einwanderung von Granulozyten in den *Sulcus gingivae* und hatte einen Einfluss auf die Expression der untersuchten Oberflächenantigene CD11b und CD15. Die Hypothese, dass ein standardisierter inflammatorischer Reiz gegenüber einer Negativkontrolle eine gesteigerte PMN-Einwanderung in den *Sulcus gingivae* auslöst (**H1**), wird damit bestätigt.

Es ist bekannt, dass bei DM durch eine hyperinflammatorische Wirtsantwort bei bakterieller Invasion das Erscheinungsbild parodontaler Erkrankungen wesentlich beeinflusst wird (Hugoson et al., 1989; Ringelberg et al., 1977; Salvi et al., 2005). Bereits in den Vorversuchen deutete sich an, dass der inflammatorische Reiz bei den Diabetikern eine stärkere Einwanderung von PMN in den Sulcus hervorrief. Auch die Anzahl der PMN, die in den Sulcus des Kontrollzahnes, in welchen ein nicht chemotaktisch wirksames Placebo (PBS) appliziert wurde (nicht stimulierter Ansatz), einwanderten, war

bei den Diabetikern höher als bei den Parodontitispatienten und den Gesunden. Das gleiche Verhalten konnte in den Hauptversuchen festgestellt werden. Entsprechend war die Anzahl der 35 Minuten nach Reiz- beziehungsweise Placeboapplikation eingewanderten PMN_{SF} bei den Diabetikern am höchsten. Die größten Differenzen der CD45+ Zellen von stimulierten abzüglich nicht stimulierten Ansätzen und damit die stärkste Reaktion auf den inflammatorischen Reiz, wurden in der Gruppe der Diabetiker beobachtet (Median: 15.363 Zellen). Die Hypothese, dass die Anzahl der nach Setzen eines inflammatorischen Reizes in den *Sulcus gingivae* eingewanderten PMN bei Diabetikern mit Parodontitis im Vergleich zu Patienten mit Parodontitis und Gesunden vermindert ist (**H2**), wird demnach widerlegt.

Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen stellten GOLUB ET AL. (Golub et al., 1982) im Tierexperiment mit diabetischen Ratten im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren und unter Verwendung einer ähnlichen Methode eine verminderte Anzahl einwandernder Granulozyten fest. In dieser Studie wurde die sulculäre Einwanderungskinetik nach Caseinapplikation (2 mg/ml) über einen Zeitraum von 45 Minuten untersucht. Die Auszählung der Granulozyten erfolgte lichtmikroskopisch unter Verwendung eines Hämatozytometers. Bei den diabetischen Tieren wanderten weniger Granulozyten ein, als bei den gesunden Kontrolltieren. Auch *ex vivo* kamen sie mit Hilfe der Agarose-Gel Methode und peritonealen PMN von Ratten zu dem gleichen Ergebnis. Das Ergebnis ihrer Untersuchungen wurde als Chemotaxisdefekt aufgrund von Diabetes mellitus interpretiert. Auch in Studien an menschlichen PMN (Delamaire et al., 1997; Shetty et al., 2008) wurde bei Diabetikern über eine verminderte Chemotaxis berichtet. Die in diesen Studien angewandten Chemotaxis-Assays wurden im Gegensatz zu der vorliegenden Studie an isolierten PMN_{pB} und *in vitro* durchgeführt.

Im Anschluss an die Tierexperimente wendete die Arbeitsgruppe um GOLUB das Verfahren zur Testung der lokalen Chemotaxis im *Sulcus gingivae* bei Menschen an. Zunächst untersuchten sie 5 gesunde Probanden. Das Maximum der leukozytären Antwort lag dabei bei 25 Minuten und betrug bis zu 4000 Granulozyten. Die Mediane der PMN der Gesunden und der Parodontitispatienten lagen in der eigenen Untersuchung in einem ähnlichen Bereich. Das Maximum der leukozytären Antwort wurde jedoch bereits nach 15 Minuten gemessen. Auch die Sondierungstiefen der Sulci, die zur Probenentnahme herangezogen wurden, sind mit denen in der vorliegenden Studie vergleichbar und in beiden Studien war die Gingiva an den Testzähnen klinisch entzündungsfrei. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie lag das mittlere Alter mit $22,2 \pm 2$ Jahre wesentlich niedriger und es fand zuvor keine Mundhygienephase statt. Zudem erfolgte die Sulcuswaschung nach 15 Minuten alle 5 Minuten und wurde mit der Me-

thode nach SCRAPSKI UND LEHNER (1976) durchgeführt. Möglicherweise führten die längeren Intervalle von 10 Minuten zwischen den Entnahmezeitpunkten im Vergleich zu den Experimenten von GOLUB (1981) und IACONO (1985) (5 minütige Abnahmeintervalle) zu den höheren Zellzahlen.

Die von GOLUB entwickelte Methode zur Testung der lokalen Chemotaxis im *Sulcus gingivae* wurde im Weiteren bei Patienten mit Gingivitis (n = 7), chronischer Parodontitis (n = 7), juveniler Parodontitis (n = 11) sowie bei einem Patienten mit insulinabhängigem DM und chronischer Parodontitis angewandt. Im Vergleich zu gesunden Probanden (n = 5) wanderten bei allen Patienten mit einer oralen Erkrankung mehr Zellen ein. Die Zellzahlen des Patienten mit Diabetes lagen mit einem Maximalwert von ca. 14.000 Granulozyten/Waschung in einem ähnlichen Bereich wie die maximalen Zellzahlen der Patienten mit chronischer Parodontitis. Bei den Patienten mit juveniler Parodontitis und dem Patienten mit Diabetes konnte zudem ein atypischer Verlauf der leukozytären Einwanderungskinetik mit zwei Maxima beobachtet werden. Bei dem Diabetiker kam es zum Zeitpunkt 20 Minuten zum Maximum der leukozytären Einwanderung, woraufhin die Zellzahl wieder sank und bei 30 Minuten wieder anstieg (Iacono et al., 1985). Auch in der vorliegenden Studie konnte bei den Diabetikern ein erneuter Anstieg der PMN-Anzahl, jedoch zum Zeitpunkt 45 Minuten, festgestellt werden, wohingegen die Zellzahlen bei den anderen Gruppen auf das Ausgangsniveau zurückkehrten.

Die vorliegende Studie hat in Bezug auf Gesunde (n = 10), Parodontitispatienten (n = 10) und Diabetiker (n = 10) einen wesentlich größeren Stichprobenumfang. Die Basis für den gewählten Stichprobenumfang stellte die bisherige Literatur zum bearbeiteten Themenkomplex und die Vorversuche dar und wurde zusammen mit der Abteilung für medizinische Statistik festgelegt. Des Weiteren erfolgte die Probengewinnung aus gesunden Sulci mit einer vergleichbaren Sondierungstiefe (mediane ST Testzahn: DM2+P = 2,3 mm; C = 1,8 mm; P = 2,2 mm), wodurch den Zellen eine ähnliche Oberfläche zur Auswanderung zur Verfügung stand. Bei IACONO ET AL. (1985) wurden die Proben der Parodontitispatienten hingegen aus Taschen unterschiedlicher ST entnommen und sowohl bei den Gingivitispatienten als auch bei den Parodontitispatienten herrschte eine klinisch sichtbare gingivale Entzündung vor (Gingival-Index 1 bis 2). Da eine gingivale Entzündung und unterschiedliche Sondierungstiefen die Anzahl und Oberflächenstruktur einwandernder PMN beeinflussen könnte, wurden in der vorliegenden Studien nur gesunde Parodontien ohne gingivale Entzündung zur Probenentnahme herangezogen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Studie von IACONO ET AL. (1985) lag der Median der in den Sulcus eingewanderten PMN in den Vor- und Hauptversuchen der ei-

genen Studie bei den Parodontitispatienten etwas unterhalb der PMN-Anzahl der Gesunden. Ein statistischer Unterschied wurde nicht nachgewiesen. Während es zahlreiche Studien gibt, die eine verminderte PMN-Chemotaxis bei aggressiver Parodontitis belegen (Meyle, 1993; Palmer, Watts, & Addison, 1993; Sigusch, Eick, Pfister, Klinger, & Glockmann, 2001), ist dies für die chronische Parodontitis nicht der Fall. In Studien über die PMN-Chemotaxis bei Patienten mit chronischer Parodontitis wurden keine Veränderungen (Altman, Page, Vandesteen, Dixon, & Bradford, 1985; Hidalgo, Avila-Campos, Trevisan, Mocelin, & Itano, 1997; Tufano, Ianniello, Sanges, & Rossano, 1992) oder eine verstärkte Chemotaxis gegenüber Gesunden (Meyle, 1993) festgestellt. In diesen Untersuchungen wurde die Chemotaxis *ex vivo* an PMN getestet, die aus peripherem Blut isoliert wurden, wohingegen in der vorliegenden Studie die *in vivo* Chemotaxis von sulculäre PMN betrachtet wurde. Da sich die Bedingungen *ex vivo* und *in vivo* sowie der Aktivierungszustand von PMN_{PB} und PMN_{SF} wesentlich voneinander unterscheiden (Asman, Gustafsson, & Bergstrom, 1997; Watanabe, Hagen, & Andersen, 1991), lassen sich die eigenen Ergebnisse nur bedingt mit der bisherigen Literatur vergleichen. Weiterhin könnte der Unterschied in der geringen Anzahl von PMN_{SF} bei den Parodontitispatienten im Vergleich zu den Gesunden auch darin begründet liegen, dass die Anzahl der PMN_{PB} bei den Gesunden eindeutig höher war als bei den Parodontitispatienten ($p = 0,916$; t-Test). Zwar wurden Personen mit akuten oder chronischen Infektionen innerhalb der letzten 6 Monate vor Studienbeginn nicht in die Studie aufgenommen, leichte subklinische Infektionen oder falsche Angaben durch die Patienten beziehungsweise Probanden lassen sich jedoch nicht ausschließen. Zudem lag der Wert für das CRP bei 2 Gesunden aber bei keinem Parodontitispatienten geringfügig oberhalb des Referenzbereichs. Bei einem Stichprobenumfang von $n = 10$ könnte dies bereits einen Einfluss auf die Ergebnisse haben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten auf eine eindeutig gesteigerte Entzündungsreaktion bei DM Typ 2 hin, die sich lokal durch das hier vorgestellte Testverfahren nachweisen lässt. Dieses Ergebnis liefert einen Erklärungsansatz für die bereits diskutierten erhöhten gingivalen Entzündungsparameter (Hugoson et al., 1989; Salvi et al., 2005) sowie die erhöhte Prävalenz und Schwere der Parodontitis bei Diabetikern (Chavarry et al., 2009).

SIMA ET AL. (2010) konnten bei ihren *in vivo* Untersuchungen an diabetischen Mäusen und Kontrolltieren feststellen, dass die vaskuläre Permeabilität der Testtiere eindeutig höher war als die der gesunden Tiere. Auch die Anzahl der in den gingivalen Kapillaren am Endothel entlangrollenden Leukozyten war nach Injektion von $TNF-\alpha$ zwischen die Inzisiven der Tiere, bei den diabetischen Mäusen eindeutig höher als bei

den Kontrolltieren. Sie stellten ebenfalls eine gesteigerte Oberflächenexpression des Leukozytenintegrins CD11a fest, welches bei der Diapedese von Granulozyten eine entscheidende Rolle spielt. In den gingivalen Biopsien wurde bei den diabetischen Mäusen eine statistisch höhere Expression von P-Selektin festgestellt, welches ebenfalls an der Diapedese von Granulozyten beteiligt ist. Aufgrund dieser Ergebnisse stellte die Arbeitsgruppe die Hypothese auf, dass eine chronische Hyperglykämie einen proinflammatorischen Zustand der gingivalen Mikrozirkulation induziert, der durch eine erhöhte vaskuläre Permeabilität gekennzeichnet ist. Diese Hypothese liefert einen Erklärungsansatz für die in der vorgestellten Studie beschriebenen höheren Anzahlen der auf inflammatorische Reizung eingewanderter PMN_{SF} bei Diabetikern.

Eine weitere Hypothese zur Ursache gesteigerter PMN-Anzahlen bei Diabetikern stützt sich auf Studien, welche bei Diabetikern eine Beeinträchtigung der Phagozytose und der intrazellulären Abtötung von phagozytierten Mikroorganismen feststellten (Lecube et al., 2011; Marhoffer et al., 1992). Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Anzahl der auf einen entzündlichen Reiz einwandernden PMN_{SF} bei Patienten mit DM Typ 2 könnte demnach darin liegen, dass das Immunsystem die verminderte Phagozytosefähigkeit der PMN durch eine höhere Anzahl dieser Zellen auszugleichen versucht.

Des Weiteren ist die Produktion und Freisetzung von ROS bei Patienten mit Diabetes und Parodontitis gesteigert (Karima et al., 2005). Der durch die veränderte Zellfunktion gesteigerte Sauerstoffverbrauch könnte zu einer Hypoxie im gingivalen Gewebe der Diabetiker führen. Hypoxie stellt für den Körper einen Reiz zu Neoangiogenese dar, um den Sauerstoffmangel zu kompensieren. Auf diese Weise könnte es bei Diabetikern zu einer stärkeren Ausbildung des gingivalen Gefäßplexus kommen. Mehr Kapillaren transportieren mehr Zellen vor Ort. Im Weiteren würde den PMN durch die zahlreicheren Gefäßwände eine größere Oberfläche zur Verfügung stehen um das Gefäßsystem zu verlassen und durch das Gewebe in den *Sulcus gingivae* zu migrieren. Tatsächlich konnten SAKALLIOGLU ET AL. (2007) im parodontalen Gewebe diabetischer Ratten (n = 10) im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren (n = 10) einen höheren osmotischen Druck und eine gesteigerte Anzahl von Gefäßen feststellen und stützen somit die aufgestellte Hypothese. Die erhöhte Anzahl von Kapillaren könnte auch die in den eigenen Untersuchungen bei den Diabetikern beobachtete hohe Anzahl von PMN_{SF} an den Kontrollzähnen erklären. Demnach würde es sich bei dieser Beobachtung nicht um eine gesteigerte *random-migration* der PMN handeln, sondern um einen Effekt, der auf der größeren für Diapedese zur Verfügung stehenden Oberfläche basiert.

Im Gegensatz dazu steht die Tatsache, dass langfristige Hyperglykämie als Folgeschäden Mikrozirkulationsstörungen in den terminalen Strombahnen hervorruft. Der

Schweregrad dieser Angiopathien kann sich bis zu Makroangiopathien und Nekrosen des zu versorgenden Gewebes steigern (ADA, 2010). Bei den Diabetikern in dieser Studie handelte es sich um frisch diagnostizierte Fälle und nicht um langjährige Fälle. Patienten mit Symptomen von Mikro- oder Makroangiopathien wurden aus der Studie ausgeschlossen.

FARAH ET AL. (2008) stellten bei Patienten mit DM Typ 2 ($n = 30$) im Vergleich zu Gesunden eindeutig höhere PMN-Anzahlen im peripheren Blut fest. Dies könnte ebenfalls eine Rolle bei der PMN-Einwanderung spielen. Sie beobachteten des Weiteren, dass es nach zweimonatiger Therapie mit Metformin zu einem Anstieg der PMN-Anzahl kam. Der HbA1c korrelierte in dieser Untersuchung mit der PMN-Anzahl des peripheren Blutes ($r = 0,5$; $p = 0,0008$). Auch Insulin kann die Anzahl peripher zirkulierender PMN beeinflussen. So wurde in einer klinischen Studie an 8 gesunden Probanden, welche unter euglykämischen Bedingungen über einen Zeitraum von 4 Stunden durch Infusion einem hyperinsulinem Zustand ausgesetzt wurden, ein statistisch eindeutiger Anstieg der peripheren PMN nachgewiesen (Walrand, Guillet, Boirie, & Vasson, 2004). In der eigenen Studie wurde kein Unterschied in der Anzahl der PMN_{pB} zwischen den Gesunden und den Diabetikern festgestellt ($p = 0,916$). Auch der Unterschied zwischen den Diabetikern und den Parodontitispatienten war nicht eindeutig ($p = 0,051$; t-Test), wohingegen sich zwischen den Gesunden und den Parodontitispatienten eindeutige Unterschiede ergaben ($p = 0,024$; t-Test). Da bei der PMN_{sF} -Einwanderung kein Unterschied zwischen den Gesunden und den Parodontitispatienten bestand und die Werte bei den Gesunden deutlich unter denen der Diabetiker lagen, ist ein Einfluss der Anzahl der PMN_{pB} auf die PMN_{sF} -Einwanderung in den *Sulcus gingivae* nicht nachzuweisen.

Das Fettgewebe (Adipozyten) und damit verbunden der BMI, scheinen die Entzündungsreaktion von Diabetikern ebenfalls zu beeinflussen. Eine aktuelle Hypothese geht davon aus, dass in das Fettgewebe von Diabetikern vermehrt Makrophagen einwandern und dort zu einer gesteigerten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, wie beispielsweise IL-1 β , TNF, Chemokin-Ligand 2 (CCL2), Chemokin-Ligand 3 (CCL3) und Chemokin-Ligand 8 (CXCL 8), führen. Die Anzahl der Makrophagen scheint dabei im Zusammenhang mit dem Grad der Fettleibigkeit zu stehen. Als Folge kommt es zu einer Rekrutierung weiterer Immunzellen, die sich an dem Entzündungsgeschehen im Fettgewebe beteiligen. Die Freisetzung der entstehenden Zytokine und Chemokine aus dem Fettgewebe in den zirkulierenden Blutstrom begünstigt die Entstehung und Unterhaltung von Entzündungen in anderen Geweben zu denen auch das Parodont gehört (Donath & Shoelson, 2011). Da das Parodont aller Zähne eine

erhebliche Fläche darstellt und sich das Immunsystem dort mit verschiedensten Mikroorganismen auseinandersetzt, scheint es nur logisch zu sein, dass es auch hier zu einer gesteigerten Immunantwort des Körpers kommt.

Insgesamt deuten die Ergebnisse der diskutierten Studien ebenfalls auf einen Zusammenhang zwischen der Anzahl von PMN und Diabetes hin, zeigen jedoch auch auf, dass ein Einfluss therapeutischer Wirkstoffe auf die Anzahl der in den Sulcus einwandernden Zellen nicht ausgeschlossen werden kann.

6.2.8 PMN-Oberflächenexpression CD11b und CD15

Die Applikation eines inflammatorischen Reizes (Casein) in den *Sulcus gingivae* führte zu einer eindeutig höheren PMN-Oberflächenexpression von CD11b und CD15 ($p = 0,0161$ und $p = 0,0379$; Vorzeichen-Rang Test). Die höchsten Werte wurden bei den Diabetikern gemessen, die niedrigsten bei den Parodontitispatienten. Diese Unterschiede waren statistisch eindeutig. Der Median der Differenzen der Fluoreszenzen aus stimuliertem und nicht stimuliertem Ansatz und damit die Reaktion der Rezeptorexpression auf den inflammatorischen Reiz war jedoch für alle Gruppen bezüglich der beiden untersuchten Rezeptoren ähnlich. Die Hypothese, dass die Expression des leukozytären Oberflächenrezeptors CD11b auf sulculären PMN von Diabetikern mit Parodontitis im Vergleich zu Patienten mit Parodontitis und Gesunden nach Stimulation mit einem inflammatorischen Reiz erhöht ist (**H3**) wurde demnach nicht bestätigt, da nur die Unterschiede zwischen Diabetikern und Parodontitispatienten eindeutig waren. Dasselbe gilt für die Hypothese, dass die Expression des leukozytären Oberflächenrezeptors CD15 auf sulculären PMN von Diabetikern mit Parodontitis im Vergleich zu Patienten mit Parodontitis und Gesunden nach Stimulation mit einem inflammatorischen Reiz erhöht ist (**H4**).

ASMAN ET AL. (1997) bestimmten die Oberflächenexpression der Rezeptoren CD11b und CD15 an unterschiedlich schwer erkrankten Stellen bei Parodontitispatienten. Dazu entnahmen sie Proben von Stellen mit und ohne parodontale Destruktion. Bei den Kontrollen entnahmen sie Proben von Stellen mit Gingivitis. Sie konnten keine Unterschiede in der Oberflächenexpression der untersuchten Membranmoleküle und der Anzahl der positiv gefärbten Zellen nachweisen. Verglichen mit den PMN_{PB} zeigten die PMN_{SF} jedoch einen statistisch eindeutigen Anstieg der Fluoreszenzintensität aller Oberflächenantigene. Die Arbeitsgruppe schlussfolgerte daraus, dass die Migration von PMN aus den Kapillaren in den gingivalen Sulcus die Expression der untersuchten Membranmoleküle zwar beeinflusst, verschiedene lokale Entzündungszustände sich

jedoch nicht auswirken. Ähnlich wie in der eigenen Untersuchung, war die Streuung der Fluoreszenzintensitäten in dieser Studie bei den PMN_{SF} recht breit. Dies könnte in verschiedenen Aktivierungszuständen der Zellen begründet liegen. Zudem kommt es während der Migration der PMN_{SF} durch das Gewebe zu einem intensiven Kontakt mit der extrazellulären Matrix und zu einer erheblichen Verformung der Zellen. Dies führt neben einer höheren Expression des CD11b Antigens auf PMN_{SF} im Vergleich zu PMN_{pB} ebenfalls zu einer größeren Streuung (Watanabe et al., 1991).

Im Gegensatz zu der oben diskutierten und der eigenen Studie gibt es auch Untersuchungen, die bei Parodontitispatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf eine gesteigerte PMN_{SF}-Oberflächenexpression des CD11b-Antigens hinweisen (Biselli, Ferlini, Di Murro, Paolantonio, & Fattorossi, 1995; Watanabe et al., 1997). Im peripheren Blut von Parodontitispatienten wurde dieser Unterschied nicht nachgewiesen (Pietruska, Zak, Pietruski, & Wysocka, 2005; Watanabe et al., 1997).

Verschiedene Studien kamen zu dem Ergebnis, dass bei Patienten mit DM Typ 2 die Oberflächenexpression des CD11b Antigens auf PMN_{pB} im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen erhöht ist und interpretierten dies als einen proinflammatorischen Zustand der Zellen (Advani, Marshall, & Thomas, 2002; Delamaire et al., 1997; Mastej & Adamiec, 2008; van Oostrom, van Wijk, Sijmonsma, Rabelink, & Castro Cabezas, 2004). Eine mögliche Ursache scheint die verminderte intrazelluläre Aktin-Polymerisation zu sein, die eine Ablösung des betreffenden Rezeptors verhindert (Advani et al., 2002). Auch bei Monozyten führen *in vitro* erhöhte Konzentrationen von nichtveresterten Fettsäuren, wie sie bei Patienten mit DM Typ 2 in der Regel vermehrt vorkommen, zu einem statistisch eindeutigen Anstieg der Oberflächenexpression von CD11b und einer höheren Adhäsion an Endothelzellen (Zhang et al., 2006). Im Gegensatz dazu war in einer weiteren Studie, in der nur PMN_{pB} von Diabetikern Typ 2 ohne Angiopathien untersucht wurden, die Oberflächenexpression von CD11b nicht verschieden (Mastej & Adamiec, 2009). Auch in der hier vorgestellten Studie wurden Patienten mit bekannten vaskulären Komplikationen ausgeschlossen. Ein möglicher Einfluss dieser Komplikation auf das Ergebnis kann daher ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Oberflächenexpression des CD11b-Antigens wird in der Behandlung mit oralen Antidiabetika vermutet. So konnte in einer Studie an isolierten PMN_{pB} von Patienten mit DM Typ 2 (n = 30) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (n = 20) nicht nur eine höhere Expression des CD11b Oberflächenantigens nachgewiesen, sondern auch unterschiedliche Effekte bei der Behandlung mit Metformin oder Rosiglitazon festgestellt werden. Bei den mit Metformin behandelten Patienten wurde nach 2 Monaten ein eindeutiger Anstieg der CD11b Oberflächenexpression

festgestellt, wohingegen Patienten, die mit Rosiglitazon behandelt wurden, einen Rückgang der Oberflächenexpression zeigten (Farah et al., 2008). Seit November 2010 dürfen in Deutschland Arzneimittel mit dem Wirkstoff Rosiglitazon nicht mehr vertrieben werden (Pressemitteilung 11/10; Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte). Ein Einfluss dieses Wirkstoffes auf die Ergebnisse kann daher ausgeschlossen werden. Insulin scheint unter euglykämischen Bedingungen bei gesunden Probanden die Anzahl der Rezeptoren CD11b und CD15 auf PMN_{pB} ebenfalls zu reduzieren (Walrand et al., 2004). In der eigenen Untersuchung war die Expression dieser beiden Rezeptoren jedoch bei den Diabetikern, die alle mit Insulin und/oder oralen Antidiabetikern behandelt wurden, am höchsten und steht somit im Gegensatz zu den Ergebnissen von WALRAND (2004).

7. Zusammenfassung

Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis sind multifaktorielle Erkrankungen mit einer hohen Prävalenz und scheinen in einem bidirektionalen Zusammenhang miteinander zu stehen (Lalla & Papapanou, 2011). Neben einem proinflammatorischen Zustand des Immunsystems (Donath & Shoelson, 2011) und einer durch klinische Studien belegten ausgeprägten gingivalen Entzündungsreaktion auf den bakteriellen Biofilm (Hugoson et al., 1989; Salvi et al., 2005), wurde bei Diabetikern *in vitro* eine verminderte Chemotaxis von peripheren polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) festgestellt (Delamaire et al., 1997; Shetty et al., 2008). PMN sind die primären phagozytären Zellen der akuten Immunantwort und die in der Sulcusflüssigkeit vorherrschende Zellart (Cimasoni, 1983).

In der vorgestellten Arbeit wurde die *in vivo* Chemotaxis von PMN im *Sulcus gingivae* von Diabetikern mit Parodontitis (n = 10) untersucht. Als Kontrollgruppen dienten Parodontitispatienten und Gesunde (jeweils n = 10).

Alle Teilnehmer erhielten eine vollständige zahnärztliche und parodontologische Untersuchung und nahmen an einer 14-tägigen Mundhygienephase teil. Die Testung der lokalen Chemotaxis erfolgte nach Abschluss der Mundhygienephase an parodontal gesunden Zähnen im Oberkiefer. Die PMN wurden dabei mit der Methode nach MEYLE (1986) aus dem Sulcus entnommen. Dazu wurde nach Baseline-Waschung in den Sulcus eines Testzahnes (stimulierter Ansatz; Sondierungstiefe ≤ 3 mm, klinisch gesunde Gingiva) ein inflammatorischer Reiz (Casein) und in den des kontralateralen Zahnes (nicht stimulierter Ansatz am Kontrollzahn) ein Placebo (PBS) appliziert. 35 Minuten später wurden die in die Sulci eingewanderten Zellen ausgewaschen. Die in den Proben enthaltenen PMN wurden durchflusszytometrisch gezählt und die Oberflächenexpression der für die Diapedese wichtigen Rezeptoren CD11b und CD15 bestimmt.

Für alle Parameter ergab sich ein eindeutiger Unterschied zwischen stimuliertem und nicht stimuliertem Ansatz (jeweils $p < 0,05$; Vorzeichen-Rang-Test). Die Summe der in beide Ansätze eingewanderten PMN war bei den Diabetikern am höchsten (Median: 32.751). Auch die chemotaktische Reaktion auf den inflammatorischen Reiz war bei den Diabetikern am größten (Median: 15.363). Statistisch eindeutige Unterschiede ergaben sich für alle Parameter zwischen Diabetikern mit Parodontitis und den systemisch gesunden Parodontitispatienten (jeweils $p < 0,05$; Mediantest).

Die Ergebnisse dieser Studie belegen erstmals in einer klinisch-experimentellen Studie eine gesteigerte lokale parodontale Entzündungsreaktion bei Diabetikern Typ 2.

8. Summary

Diabetes mellitus type 2 and periodontitis are both multifactorial diseases with a high prevalence and recent studies indicate a bidirectional linkage between them (Lalla & Papapanou, 2011). In addition to a pro-inflammatory state of the immune system (Donath & Shoelson, 2011) and an enhanced inflammatory reaction of gingival tissue to bacterial biofilms (Hugoson et al., 1989; Salvi et al., 2005), various studies suggest an impaired chemotaxis in peripheral polymorphonuclear neutrophils (PMN) in diabetics (Delamaire et al., 1997; Shetty et al., 2008). PMN are the primary cells of the innate immune system and the predominant type of leukocytes in gingival crevicular fluid (Cimasoni, 1983).

The aim of this study was to investigate the *in vivo* chemotaxis of sulcular PMN from patients with diabetes mellitus type 2 and periodontitis ($n = 10$). Systemically healthy individuals with ($n = 10$) and without periodontitis ($n = 10$) served as controls.

All participants received a full dental and periodontal examination and an oral hygiene phase (14 days). After completion of the oral hygiene phase, local chemotaxis was tested. Sulcular PMN were sampled with the method of MEYLE (1986). After a baseline-wash, either a chemoattractant (casein, testtooth) or a placebo (PBS, controltooth) was pipetted into the gingival crevice (probing depth ≤ 3 mm, clinically healthy gingiva). After 35 minutes, crevices were rinsed again and samples were collected. PMN counts and membrane molecules involved in diapedesis (CD11b and CD15) were analysed employing flow cytometry.

For all parameters, there was a statistically significant difference between test- and controlteeth ($p < 0.05$; Signed-Rank-Test). The highest total number of PMN from test- and controlteeth was detected in diabetics (median: 32,751) as well as the widest difference between test- and controlteeth (median: 15,363). Statistical significant differences were detected in all parameters between diabetics with periodontitis and systemically healthy patients with periodontitis ($p < 0.05$; Median-Test).

For the first time in a clinical experimental study, these results clearly demonstrate an enhanced inflammatory reaction even in healthy sites of patients with diabetes type 2 and periodontitis.

9. Abkürzungsverzeichnis

ADA	The American Diabetes Organization
ADC	Analog-Digital-Übersetzer
AGEs	Advanced Glycation End Products
AP	Aggressive Parodontitis
APC	Allo-Phyco-Cyanin
aq. bidest.	aqua bidestillata
BL	Baseline
BMI	Body-Mass-Index
BOP	Sondierungsblutung
C	Kontrollgruppe
Ca ²⁺	Kalzium-Ionen
CAL	klinisches Attachmentniveau
CB	counting beads
CD	Cluster of Differentiation
CR3	Komplement-Rezeptor 3
CRP	C-reaktives Protein
DAG	Diacylglyceride
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DM	Diabetes mellitus
DM2+P	Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und chronischer Parodontitis
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FcγR	Fcγ-Rezeptor
FITC	Fluorescein isothiocynat
FK	Furkationsgrad
FL	Filter
fMLF	N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FS	Vorwärtsstreuung
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GDM	Gestationsdiabetes
GR	Gingivalrand
HbA1c	Hämoglobin A1c
hs	high sensitive
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1

IDF	International Diabetes Federation
IFG	abnorme Nüchter-Plasmaglukose
Ig	Immunglobulin
IGT	gestörte Glukosetoleranz
IL	Interleukin
Isotypenctr.	Isotypenkontrolle
LAD	Leukozyten-Adhäsionsdefekt-Syndrom
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LFA-1	Leukocyte Function associated Antigen-1
Log	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharid
LTB ₄	Leukotriene B4
MAC-1	Makrophagen Antigen 1
Mg ²⁺	Magnesium-Ionen
MHI	Mundhygieneindizes
MMPs	Matrix-Metallo-Proteinasen
MPO	Myeloperoxidase
MS	Microsoft®
NK	Natürliche Killerzellen
o. Ä.	oder Ähnliches
OGTT	oraler Glukosetoleranztest
P	Patienten mit Parodontitis
PBI	Papillenblutungsindex
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBS(-/-)	phosphatgepufferte Kochsalzlösung ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
PGE2	Prostaglandin E2
PLI	Plaqueindex
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PMN _{pB}	Neutrophile Granulozyten aus peripherem Blut
PMN _{PER}	Neutrophile Granulozyten aus dem Peritonealraum
PMN _{SF}	Neutrophile Granulozyten aus Sulcusflüssigkeit
PP	Polypropylen-Falcon
PTM	Photodetektor
PTW	digitaler Periotronwert
PZR	professionelle Zahnreinigung

RAGEs	Receptor-AGEs
ROS	Reaktive Sauerstoffverbindungen
SF	Sulcusflüssigkeit
SFFR	Sulcusflüssigkeits-Fließrate
SS	Seitwärtsstreuung
ST	Sondierungstiefe
ST _{ges}	Sondierungstiefe des Gesamtgebisses
TNF	Tumornekrosefaktor
WHO	World Health Organisation

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Blutglukosegehalt nach der oralen Gabe von 75 g Glukose	3
Abbildung 2: Entzündungszustände des Parodonts.....	8
Abbildung 3: Stoffwechselweg diabetischer Parodontitispatienten nach Nassar et al.	15
Abbildung 4: Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Adipozyten	16
Abbildung 5: Schematische Darstellung der transepithelialen Migration neutrophiler Granulozyten	19
Abbildung 6: Boyden-Kammer.....	22
Abbildung 7: Entnahme von Sulcusflüssigkeit.....	30
Abbildung 8: Schematischer Aufbau des SF-Absaugsystems.....	30
Abbildung 9: Lokale experimentelle Entzündungsreaktion durch Casein	31
Abbildung 10: Durchflusszytometrische Darstellung einer SF-Probe	33
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Aufteilung der SF-Probe	38
Abbildung 12: In den <i>Sulcus gingivae</i> eingeführtes Periopaper®.....	41
Abbildung 13: Zytozentrifugenpräparate; Pappenheim-Färbung.....	45
Abbildung 14: Durchflusszytometrische Darstellung aus dem <i>Sulcus gingivae</i> gewonnener PMN _{SF}	46
Abbildung 15: Durchflusszytometrische Darstellung aus peripherem Blut isolierter PMN _{pB}	46
Abbildung 16: Repräsentative durchflusszytometrische Darstellung der Oberflächenrezeptormarkierung von PMN _{SF}	47
Abbildung 17: PMN _{SF} -Einwanderungskinetik bei Gesunden	48
Abbildung 18: PMN _{SF} -Einwanderungskinetik bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis	49
Abbildung 19: PMN _{SF} -Einwanderungskinetik bei Parodontitispatienten	49
Abbildung 20: PMN _{SF} -Einwanderungskinetik der stimulierten Ansätze aller Diagnosegruppen	50
Abbildung 21: Sondierungstiefen an Test- und Kontrollzähnen.....	53
Abbildung 22: Veränderungen des Papillenblutungsindex (PBI)	54
Abbildung 23: PBI am Tag -14 und Tag 0.....	55
Abbildung 24: Veränderungen des Plaqueindex	57
Abbildung 25: Plaqueindex an Tag -14 und Tag 0	58
Abbildung 26: Veränderungen der Sulcusflüssigkeits-Volumina	59
Abbildung 27: Sulcusflüssigkeits-Volumen pro 30 Sekunden an Tag -14 und Tag 0.	60
Abbildung 28: Gesunder Proband	61

Abbildung 29: Patient mit Diabetes Typ 2 und chronischer Parodontitis	62
Abbildung 30: Patient mit chronischer Parodontitis	63
Abbildung 31: Plasma-Glucose-Werte	64
Abbildung 32: HbA1c-Werte	65
Abbildung 33: Body-Mass-Index (BMI)	66
Abbildung 34: C-reaktives Protein	67
Abbildung 35: Blutsenkung nach 1 und 2 Stunden	68
Abbildung 36: Anzahl neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut	69
Abbildung 37: Anzahl CD45+ Zellen mit globalem Median für stimulierten und nicht stimulierten Ansatz	70
Abbildung 38: Grafische Darstellung der diagnosebezogenen Mediane CD45+ Zellen im stimulierten und nicht stimulierten Ansatz	71
Abbildung 39: Gruppenvergleich der Anzahl CD45+ Zellen der stimulierten und nicht stimulierten Ansätze (Boxplot- Darstellung)	72
Abbildung 40: Summen der CD45+ Zellen von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen	73
Abbildung 41: Differenzen der CD45+ Zellen von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen	73
Abbildung 42: Fluoreszenzen (anti CD11b-APC) mit globalem Median für stimulierten und nicht stimulierten Ansatz.....	75
Abbildung 43: Grafische Darstellung der diagnosebezogenen medianen Fluoreszenzen (anti-CD11b APC)	76
Abbildung 44: Gruppenvergleich der Fluoreszenzen (anti CD11b-APC) von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen (Boxplot-Darstellung)....	77
Abbildung 45: Summen der Fluoreszenzen (anti CD11b-APC) von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen.....	78
Abbildung 46: Differenzen der Fluoreszenzen (anti CD11b-APC) von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen.....	78
Abbildung 47: Fluoreszenzen (anti CD15-FITC) mit globalem Median für stimulierten und nicht stimulierten Ansatz.....	80
Abbildung 48: Grafische Darstellung der diagnosebezogenen Mediane der an den PMN _{SF} von Test-und Kontrollzahn gemessenen Fluoreszenzen (anti-CD15 FITC).....	81
Abbildung 49: Gruppenvergleich der Fluoreszenzen (anti CD15-FITC) von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen (Boxplot-Darstellung).....	82
Abbildung 50: Summen der Fluoreszenzen (anti CD15-FITC) von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen.....	83

Abbildung 51: Differenzen der Fluoreszenzen (anti CD15-FITC) von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen.....	84
Abbildung 52: Messergebnisse der Periotronkalibrierung	129
Abbildung 53: Regressionskurve durch Mittelwerte der Periotronkalibrierung.....	129
Abbildung 54: Beispielhafter Florida-Probe Befund für Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2	131
Abbildung 55: Befundbogen für eingehende zahnärztliche Untersuchung	132
Abbildung 56: Anamnesebogen Seite 1.....	133
Abbildung 57: Anamnesebogen Seite 2.....	134
Abbildung 58: Anamnesebogen Seite 3.....	135
Abbildung 59: Befundbogen Mundhygiene Tag -14	136
Abbildung 60: Befundbogen Mundhygiene und Anweisungen Blutentnahme Tag 0	137

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ätiologische Klassifikation von Diabetes mellitus	4
Tabelle 2: Diagnosekriterien für Diabetes mellitus	5
Tabelle 3: Klassifikation der Parodontalerkrankungen	6
Tabelle 4: Zusammenfassung der Daten zur Chemotaxis bei Diabetikern	25
Tabelle 5: Maßnahmen der Mundhygienephase	34
Tabelle 6: Papillenblutungsindex nach Saxer und Mühlemann	35
Tabelle 7: Plaqueindex nach Quigley und Hein	36
Tabelle 8: Übersicht verwendeter Antikörper	39
Tabelle 9: Demografische Daten der Studiengruppen	50
Tabelle 10: Deskriptive Auswertung der Zahnanzahl	51
Tabelle 11: Deskriptive Statistik der Sondierungstiefe (mm) des Gesamtgebisses	51
Tabelle 12: Deskriptive Statistik des Attachmentniveaus (mm) des Gesamtgebisses	52
Tabelle 13: Deskriptive Statistik der Sondierungsblutung (%)	52
Tabelle 14: Deskriptive Statistik der Sondierungstiefen an Test- und Kontrollzahn	53
Tabelle 15: Mediane und Mittelwerte des Papillenblutungsindex	56
Tabelle 16: Mediane und Mittelwerte des Plaqueindex	58
Tabelle 17: Mediane und mittlere Sulcusflüssigkeit-Volumina/30 Sekunden	60
Tabelle 18: Deskriptive Statistik der Plasma-Glukose-Werte	64
Tabelle 19: Deskriptive Statistik der HbA1c-Werte.....	65
Tabelle 20: Deskriptive Statistik des Body-Mass-Index.....	66
Tabelle 21: Verteilung der Werte des C-reaktives-Proteins.....	67
Tabelle 22: Verteilung der Blutsenkungsgeschwindigkeit oberhalb des Referenzbereiches.....	68
Tabelle 23: Deskriptive Statistik der Anzahl neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut	69
Tabelle 24: Deskriptive Statistik der globalen Anzahl CD45+ Zellen im stimulierten und nicht stimulierten Ansatz	70
Tabelle 25: Diagnosebezogene deskriptive Statistik eingewanderter CD45+ Zellen .	72
Tabelle 26: Deskriptive Statistik der Summen und Differenzen CD45+ Zellen von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen	74
Tabelle 27: Deskriptive Statistik der globalen Fluoreszenz (anti CD11b-APC) im stimulierten und nicht stimulierten Ansatz	75
Tabelle 28: Diagnosebezogene deskriptive Statistik der Floreszenzen (anti CD11b- APC)	77

Tabelle 29: Deskriptive Statistik der Summen und Differenzen der Fluoreszenzen (anti CD11b-APC) von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen	79
Tabelle 30: Deskriptive Statistik der globalen Fluoreszenz (anti CD15-FITC) im stimulierten und nicht stimulierten Ansatz	80
Tabelle 31: Diagnosebezogene deskriptive Statistik der Floreszenzen (anti CD15-APC)	82
Tabelle 32: Deskriptive Statistik der Summen und Differenzen der Fluoreszenzen (anti CD15-FITC) von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen	84
Tabelle 33: Anschlussstest für Kruskal-Wallis-H-Test bezüglich der Summe CD45+ Zellen von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen	130
Tabelle 34: Anschlussstest für Kruskal-Wallis-H-Test bezüglich der Fluoreszenz anti CD11b-APC von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen	130
Tabelle 35: Anschlussstest für Kruskal-Wallis-H-Test bezüglich der Fluoreszenz anti CD15-APC von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen	130

12. Literaturverzeichnis

- ADA. (1997). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 20(7), 1183-1197.
- ADA. (2004). Gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 27 Suppl 1, S88-90.
- ADA. (2008). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 31 Suppl 1, S55-60. doi: 10.2337/dc08-S055
- ADA. (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 33 Suppl 1, S62-69. doi: 10.2337/dc10-S062
- Advani, A., Marshall, S. M., & Thomas, T. H. (2002). Impaired neutrophil actin assembly causes persistent CD11b expression and reduced primary granule exocytosis in Type II diabetes. *Diabetologia*, 45(5), 719-727. doi: 10.1007/s00125-002-0802-0
- Altieri, D. C., & Edgington, T. S. (1988). The saturable high affinity association of factor X to ADP-stimulated monocytes defines a novel function of the Mac-1 receptor. *J Biol Chem*, 263(15), 7007-7015.
- Altman, L. C., Page, R. C., Vandesteen, G. E., Dixon, L. I., & Bradford, C. (1985). Abnormalities of leukocyte chemotaxis in patients with various forms of periodontitis. *J Periodontal Res*, 20(6), 553-563.
- Araya, A. V., Pavez, V., Perez, C., Gonzalez, F., Columbo, A., Aguirre, A., . . . Aguilon, J. C. (2003). Ex vivo lipopolysaccharide (LPS)-induced TNF-alpha, IL-1beta, IL-6 and PGE2 secretion in whole blood from Type 1 diabetes mellitus patients with or without aggressive periodontitis. *Eur Cytokine Netw*, 14(3), 128-133.
- Armitage, G. C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 4(1), 1-6. doi: 10.1902/annals.1999.4.1.1
- Armitage, G. C. (2000). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Northwest Dent*, 79(6), 31-35.
- Asman, B., Gustafsson, A., & Bergstrom, K. (1997). Gingival crevicular neutrophils: membrane molecules do not distinguish between periodontitis and gingivitis. *J Clin Periodontol*, 24(12), 927-931.
- Attström, R. (1970). Presence of leukocytes in crevices of healthy and chronically inflamed gingivae. *J Periodontal Res*, 5(1), 42-47.
- Attström, R. (1975). The roles of gingival epithelium and phagocytosing leukocytes in gingival defence. *J Clin Periodontol*, 2(1), 25-32.

- Attström, R., & Egelberg, J. (1970). Emigration of blood neutrophils and monocytes into the gingival crevices. *J Periodontal Res*, 5(1), 48-55.
- Bandyopadhyay, D., Marlow, N. M., Fernandes, J. K., & Leite, R. S. (2010). Periodontal disease progression and glycaemic control among Gullah African Americans with type-2 diabetes. *J Clin Periodontol*, 37(6), 501-509. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01564.x
- Bang, J., Cimasoni, G., Rosenbusch, C., & Duckert, A. (1973). Sodium, potassium and calcium contents of crevicular exudate: their relations to gingivitis and periodontitis. *J Periodontol*, 44(12), 770-774.
- Barillari, G., Fabbro, E., Pasca, S., & Bigotto, E. (2009). Coagulation and oxidative stress plasmatic levels in a type 2 diabetes population. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 20(4), 290-296. doi: 10.1097/MBC.0b013e328329e49b
- Berger, M., Birx, D. L., Wetzler, E. M., O'Shea, J. J., Brown, E. J., & Cross, A. S. (1985). Calcium requirements for increased complement receptor expression during neutrophil activation. *J Immunol*, 135(2), 1342-1348.
- Berglundh, T., & Donati, M. (2005). Aspects of adaptive host response in periodontitis. *J Clin Periodontol*, 32 Suppl 6, 87-107. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00820.x
- Bhatia, S. K., King, M. R., & Hammer, D. A. (2003). The state diagram for cell adhesion mediated by two receptors. *Biophys J*, 84(4), 2671-2690. doi: 10.1016/s0006-3495(03)75073-5
- Bickel, M., & Cimasoni, G. (1985). The pH of human crevicular fluid measured by a new microanalytical technique. *J Periodontal Res*, 20(1), 35-40.
- Biselli, R., Ferlini, C., Di Murro, C., Paolantonio, M., & Fattorossi, A. (1995). Flow cytometric approach to human polymorphonuclear leukocyte activation induced by gingival crevicular fluid in periodontal disease. *Inflammation*, 19(4), 479-487.
- Bissada, N. F., Schaffer, E. M., & Haus, E. (1967). Circadian periodicity of human crevicular fluid flow. *J Periodontol*, 38(1), 36-40.
- Borden, S. M., Golub, L. M., & Kleinberg, I. (1977). The effect of age and sex on the relationship between crevicular fluid flow and gingival inflammation in humans. *J Periodontal Res*, 12(3), 160-165.
- Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 33(5), 657-670. doi: 10.1016/j.immuni.2010.11.011
- Boyden, S. (1962). The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med*, 115, 453-466.

- Boyum, A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 97, 77-89.
- Brill, N. (1959a). Effect of Chewing on Flow of Tissue Fluid into Human Gingival Pockets. *Acta Odontologica Scandinavica* 17(3), 277-284.
- Brill, N. (1959b). Influence of Capillary Permeability on Flow of Tissue Fluid Into Gingival Pockets. *Acta Odontologica Scandinavica* 17(1), 23-33.
- Brill, N., Krasse, O.B. (1958). The Passage of Tissue Fluid into the Clinically Healthy Gingival Pocket. *Acta Odontologica Scandinavica*, 16(3), 233-245.
- Caffesse, R. G., & Nasjleti, C. E. (1976). Enzymatic penetration through intact sulcular epithelium. *J Periodontol*, 47(7), 391-397.
- Campus, G., Salem, A., Uzzau, S., Baldoni, E., & Tonolo, G. (2005). Diabetes and periodontal disease: a case-control study. *J Periodontol*, 76(3), 418-425. doi: 10.1902/jop.2005.76.3.418
- Carneiro, L. G., Venuleo, C., Oppenheim, F. G., & Salih, E. (2012). Proteome data set of human gingival crevicular fluid from healthy periodontium sites by multidimensional protein separation and mass spectrometry. *J Periodontal Res*, 47(2), 248-262. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01429.x
- Chavarry, N. G., Vettore, M. V., Sansone, C., & Sheiham, A. (2009). The relationship between diabetes mellitus and destructive periodontal disease: a meta-analysis. *Oral Health Prev Dent*, 7(2), 107-127.
- Cho, M. I., Garant, P. R., & Lee, Y. L. (1984). Immunohistological localization of collagen (I and III) and fibronectin in inflamed and non-inflamed gingival connective tissue and sulcular fluid of beagle dogs. *J Periodontal Res*, 19(6), 638-641.
- Ciantar, M., & Caruana, D. J. (1998). Periotron 8000: calibration characteristics and reliability. *J Periodontal Res*, 33(5), 259-264.
- Cimasoni, G. (1974). The crevicular fluid. *Monogr Oral Sci*, 3(0), 1-122.
- Cimasoni, G. (1983). Crevicular fluid up- dated. *Monogr. Oral Sci.*, 12, 1-250.
- Collison, K. S., Parhar, R. S., Saleh, S. S., Meyer, B. F., Kwaasi, A. A., Hammami, M. M., Al-Mohanna, F. A. (2002). RAGE-mediated neutrophil dysfunction is evoked by advanced glycation end products (AGEs). *J Leukoc Biol*, 71(3), 433-444.

- Commisso, L., Monami, M., & Mannucci, E. (2011). Periodontal disease and oral hygiene habits in a type 2 diabetic population. *Int J Dent Hyg*, 9(1), 68-73. doi: 10.1111/j.1601-5037.2009.00439.x
- Cutler, C. W., Machen, R. L., Jotwani, R., & Iacopino, A. M. (1999). Heightened gingival inflammation and attachment loss in type 2 diabetics with hyperlipidemia. *J Periodontol*, 70(11), 1313-1321. doi: 10.1902/jop.1999.70.11.1313
- CyAnTMADP-Bedienungsanleitung. (2004). *DakoCytomation*.
- D'Aiuto, F., Parkar, M., Andreou, G., Suvan, J., Brett, P. M., Ready, D., & Tonetti, M. S. (2004). Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. *J Dent Res*, 83(2), 156-160.
- Dai, C., Brissova, M., Hang, Y., Thompson, C., Poffenberger, G., Shostak, A., Powers, A. C. (2012). Islet-enriched gene expression and glucose-induced insulin secretion in human and mouse islets. *Diabetologia*, 55(3), 707-718. doi: 10.1007/s00125-011-2369-0
- Dale, D. C., Boxer, L., & Liles, W. C. (2008). The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*, 112(4), 935-945. doi: 10.1182/blood-2007-12-077917
- Darany, D. G., Beck, F. M., & Walters, J. D. (1992). The relationship of gingival fluid leukocyte elastase activity to gingival fluid flow rate. *J Periodontol*, 63(9), 743-747.
- Del Fabbro, M., Francetti, L., Bulfamante, G., Cribiu, M., Miserocchi, G., & Weinstein, R. L. (2001). Fluid dynamics of gingival tissues in transition from physiological condition to inflammation. *J Periodontol*, 72(1), 65-73. doi: 10.1902/jop.2001.72.1.65
- Delamaire, M., Maugendre, D., Moreno, M., Le Goff, M. C., Allannic, H., & Genetet, B. (1997). Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabet Med*, 14(1), 29-34. doi: 10.1002/(sici)1096-9136(199701)14:1<29::aid-dia300>3.0.co;2-v
- Dennison, D. K., & Van Dyke, T. E. (1997). The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontol 2000*, 14, 54-78.
- Deschner, J., Haak, T., Jepsen, S., Kocher, T., Mehnert, H., Meyle, J., Tschöpe, D. (2011). [Diabetes mellitus and periodontitis. Bidirectional relationship and clinical implications. A consensus document]. *Internist (Berl)*, 52(4), 466-477. doi: 10.1007/s00108-011-2835-2
- Devaraj, S., & Jialal, I. (2000). Low-density lipoprotein postsecretory modification, monocyte function, and circulating adhesion molecules in type 2 diabetic patients with and without macrovascular complications:

- the effect of alpha-tocopherol supplementation. *Circulation*, 102(2), 191-196.
- Diamond, M. S., Staunton, D. E., de Fougerolles, A. R., Stacker, S. A., Garcia-Aguilar, J., Hibbs, M. L., & Springer, T. A. (1990). ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol*, 111(6 Pt 2), 3129-3139.
- Donath, M. Y., & Shoelson, S. E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*, 11(2), 98-107. doi: 10.1038/nri2925
- Duckworth, W. C., Bennett, R. G., & Hamel, F. G. (1998). Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev*, 19(5), 608-624.
- Egenolf, D. h. (2010). Lokaler Nachweis der Chemotaxis polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN) über Elastasefreisetzung. *Justus-Liebig-Universität Gießen, Dissertation*.
- Elghetany, M. T., & Lacombe, F. (2004). Physiologic variations in granulocytic surface antigen expression: impact of age, gender, pregnancy, race, and stress. *J Leukoc Biol*, 75(2), 157-162. doi: 10.1189/jlb.0503245
- Embery, G., Oliver, W. M., Stanbury, J. B., & Purvis, J. A. (1982). The electrophoretic detection of acidic glycosaminoglycans in human gingival sulcus fluid. *Arch Oral Biol*, 27(2), 177-179.
- Emrich, L. J., Shlossman, M., & Genco, R. J. (1991). Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol*, 62(2), 123-131.
- Engelbreton, S. P., Hey-Hadavi, J., Ehrhardt, F. J., Hsu, D., Celenti, R. S., Grbic, J. T., & Lamster, I. B. (2004). Gingival crevicular fluid levels of interleukin-1beta and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Periodontol*, 75(9), 1203-1208. doi: 10.1902/jop.2004.75.9.1203
- Farah, R., Shurtz-Swirski, R., & Lapin, O. (2008). Intensification of oxidative stress and inflammation in type 2 diabetes despite antihyperglycemic treatment. *Cardiovasc Diabetol*, 7, 20. doi: 10.1186/1475-2840-7-20
- Fessler, A. (1977). [Hormonal contraceptives and periodontium]. *Dtsch Zahnarztl Z*, 32(1), 32-37.
- Ficara, A. J., Levin, M. P., Grower, M. F., & Kramer, G. D. (1975). A comparison of the glucose and protein content of gingival fluid from diabetics and nondiabetics. *J Periodontal Res*, 10(3), 171-175.
- Golub, L. M., Iacono, V. J., Nicoll, G., Ramamurthy, N., & Kaslick, R. S. (1981). The response of human sulcular leucocytes to a chemotactic challenge. A new in vivo assay. *J Periodontal Res*, 16(2), 171-179.

- Golub, L. M., Nicoll, G. A., Iacono, V. J., & Ramamurthy, N. S. (1982). In vivo crevicular leukocyte response to a chemotactic challenge: inhibition by experimental diabetes. *Infect Immun*, 37(3), 1013-1020.
- Griffiths, G. S., Sterne, J. A., Wilton, J. M., Eaton, K. A., & Johnson, N. W. (1992). Associations between volume and flow rate of gingival crevicular fluid and clinical assessments of gingival inflammation in a population of British male adolescents. *J Clin Periodontol*, 19(7), 464-470.
- Griffiths, G. S., Wilton, J. M., & Curtis, M. A. (1992). Contamination of human gingival crevicular fluid by plaque and saliva. *Arch Oral Biol*, 37(7), 559-564.
- Guentsch, A., Kramesberger, M., Sroka, A., Pfister, W., Potempa, J., & Eick, S. (2011). Comparison of gingival crevicular fluid sampling methods in patients with severe chronic periodontitis. *J Periodontol*, 82(7), 1051-1060. doi: 10.1902/jop.2011.100565
- Gustafsson, A., Asman, B., Bergstrom, K., & Soder, P. O. (1992). Granulocyte elastase in gingival crevicular fluid. A possible discriminator between gingivitis and periodontitis. *J Clin Periodontol*, 19(8), 535-540.
- Gustke, C. J., Stein, S. H., Hart, T. C., Hoffman, W. H., Hanes, P. J., Russell, C. M., Watson, S. C. (1998). HLA-DR alleles are associated with IDDM, but not with impaired neutrophil chemotaxis in IDDM. *J Dent Res*, 77(7), 1497-1503.
- Hara, K., & Takahashi, T. (1975). Hydroxyproline content in gingival exudate before and after periodontal surgery. *J Periodontal Res*, 10(5), 270-274.
- Herrmann, J. M., Bernardo, J., Long, H. J., Seetoo, K., McMenamin, M. E., Batista, E. L., Jr., Simons, E. R. (2007). Sequential chemotactic and phagocytic activation of human polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun*, 75(8), 3989-3998. doi: 10.1128/iai.00388-07
- Hidalgo, M. M., Avila-Campos, M. J., Trevisan, W., Jr., Mocelin, T. T., & Itano, E. N. (1997). Neutrophil chemotaxis and serum factor modulation in Brazilian periodontitis patients. *Arch Med Res*, 28(4), 531-535.
- Holmberg, K., & Killander, J. (1971). Quantitative determination of immunoglobulins (IgG, IgA and IgM) and identification of IgA-type in the gingival fluid. *J Periodontal Res*, 6(1), 1-8.
- Holtfreter, B., Kocher, T., Hoffmann, T., Desvarieux, M., & Micheelis, W. (2010). Prevalence of periodontal disease and treatment demands based on a German dental survey (DMS IV). *J Clin Periodontol*, 37(3), 211-219. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01517.x
- Hughes, B. J., Hollers, J. C., Crockett-Torabi, E., & Smith, C. W. (1992). Recruitment of CD11b/CD18 to the neutrophil surface and adherence-

- dependent cell locomotion. *J Clin Invest*, 90(5), 1687-1696. doi: 10.1172/jci116041
- Hugoson, A., Thorstensson, H., Falk, H., & Kuylensstierna, J. (1989). Periodontal conditions in insulin-dependent diabetics. *J Clin Periodontol*, 16(4), 215-223.
- Iacono, V. J., Singh, S., Golub, L. M., Ramamurthy, N. S., & Kaslick, R. (1985). In vivo assay of crevicular leukocyte migration. Its development and potential applications. *J Periodontol*, 56(11 Suppl), 56-62.
- IDF. (2009). International Diabetes Federation. Diabetes Atlas. 4th Edition. Brüssel 2009.
- Inoue, M., Maehata, E., Yano, M., Taniyama, M., & Suzuki, S. (2005). Correlation between the adiponectin-leptin ratio and parameters of insulin resistance in patients with type 2 diabetes. *Metabolism*, 54(3), 281-286. doi: 10.1016/j.metabol.2004.09.006
- Jellinger, P. S. (2011). Focus on incretin-based therapies: targeting the core defects of type 2 diabetes. *Postgrad Med*, 123(1), 53-65. doi: 10.3810/pgm.2011.01.2245
- Kanaparth, A., Kanaparth, R., & Niranjana, N. (2012). Evaluation of serum C-reactive protein levels in subjects with aggressive and chronic periodontitis and comparison with healthy controls. *Dent Res J (Isfahan)*, 9(3), 261-265.
- Karima, M., Kantarci, A., Ohira, T., Hasturk, H., Jones, V. L., Nam, B. H., Van Dyke, T. E. (2005). Enhanced superoxide release and elevated protein kinase C activity in neutrophils from diabetic patients: association with periodontitis. *J Leukoc Biol*, 78(4), 862-870. doi: 10.1189/jlb.1004583
- Karjalainen, K. M., & Knuuttila, M. L. (1996). The onset of diabetes and poor metabolic control increases gingival bleeding in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*, 23(12), 1060-1067.
- Katagiri, S., Nitta, H., Nagasawa, T., Uchimura, I., Izumiyama, H., Inagaki, K., Izumi, Y. (2009). Multi-center intervention study on glycohemoglobin (HbA1c) and serum, high-sensitivity CRP (hs-CRP) after local anti-infectious periodontal treatment in type 2 diabetic patients with periodontal disease. *Diabetes Res Clin Pract*, 83(3), 308-315. doi: 10.1016/j.diabres.2008.10.016
- Katz, N. (2008). Diagnostik am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin am UKGM Standort Gießen; http://www.ukgm.de/ugm_2/deu/ugi_kch/PDF/UNI-DRU-200_Taschenbuch_Leistungsverzeichnis_Medizinische_Klinische_Chemie.pdf

- Kerner, W., & Brückel, J. (2011). definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Diabetologie und Stoffwechsel*, 6, 107-110.
- Kornman, K. S., Page, R. C., & Tonetti, M. S. (1997). The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000*, 14, 33-53.
- Lalla, E., Cheng, B., Lal, S., Kaplan, S., Softness, B., Greenberg, E., Lamster, I. B. (2007). Diabetes-related parameters and periodontal conditions in children. *J Periodontal Res*, 42(4), 345-349. doi: 10.1111/j.1600-0765.2006.00955.x
- Lalla, E., Lamster, I. B., & Schmidt, A. M. (1998). Enhanced interaction of advanced glycation end products with their cellular receptor RAGE: implications for the pathogenesis of accelerated periodontal disease in diabetes. *Ann Periodontol*, 3(1), 13-19.
- Lalla, E., & Papapanou, P. N. (2011). Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. *Nat Rev Endocrinol*, 7(12), 738-748. doi: 10.1038/nrendo.2011.106
- Lamster, I. B. (1997). Evaluation of components of gingival crevicular fluid as diagnostic tests. *Ann Periodontol*, 2(1), 123-137.
- Last, K. S., Stanbury, J. B., & Embery, G. (1985). Glycosaminoglycans in human gingival crevicular fluid as indicators of active periodontal disease. *Arch Oral Biol*, 30(3), 275-281.
- Lecube, A., Pachon, G., Petriz, J., Hernandez, C., & Simo, R. (2011). Phagocytic activity is impaired in type 2 diabetes mellitus and increases after metabolic improvement. *PLoS One*, 6(8), e23366. doi: 10.1371/journal.pone.0023366
- Lewis, S. L., & Van Epps, D. E. (1983). Demonstration of specific receptors for fluoresceinated casein on human neutrophils and monocytes using flow cytometry. *Inflammation*, 7(4), 363-375.
- Lim, L. P., Tay, F. B., Sum, C. F., & Thai, A. C. (2007). Relationship between markers of metabolic control and inflammation on severity of periodontal disease in patients with diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*, 34(2), 118-123. doi: 10.1111/j.1600-051X.2006.01032.x
- Lindhe, J., Attström, R., & Bjorn, A. L. (1969). The influence of progestogen on gingival exudation during menstrual cycles. A longitudinal study. *J Periodontal Res*, 4(2), 97-102.
- Lindhe, J., Hamp, S. E., & Loe, H. (1975). Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. A 4-year clinical, roentgenographical and histometrical study. *J Periodontal Res*, 10(5), 243-255.

- Listgarten, M. A. (1994). The structure of dental plaque. *Periodontol* 2000, 5, 52-65.
- Löe, H. (1993). Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 16(1), 329-334.
- Löe, H., & Holm-Pedersen, P. (1965). ABSENCE AND PRESENCE OF FLUID FROM NORMAL AND INFLAMED GINGIVAE. *Periodontics*, 149, 171-177.
- Lütke-meier, D. C. (1995). Chemotaxis neutrophiler Granulozyten im menschlichen Sulcus gingivalis. *Universität Tübingen, Dissertation*.
- Makita, Z., Vlassara, H., Cerami, A., & Bucala, R. (1992). Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. *J Biol Chem*, 267(8), 5133-5138.
- Mancini, L., & Ruotolo, V. (1997). Infection of the diabetic foot. *Rays*, 22(4), 544-549.
- Marcaccini, A. M., Meschiari, C. A., Sorgi, C. A., Saraiva, M. C., de Souza, A. M., Faccioli, L. H., Gerlach, R. F. (2009). Circulating interleukin-6 and high-sensitivity C-reactive protein decrease after periodontal therapy in otherwise healthy subjects. *J Periodontol*, 80(4), 594-602. doi: 10.1902/jop.2009.080561
- Marhoffer, W., Stein, M., Maeser, E., & Federlin, K. (1992). Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. *Diabetes Care*, 15(2), 256-260.
- Markou, E., Eleana, B., Lazaros, T., & Antonios, K. (2009). The influence of sex steroid hormones on gingiva of women. *Open Dent J*, 3, 114-119. doi: 10.2174/1874210600903010114
- Mastej, K., & Adamiec, R. (2008). Neutrophil surface expression of CD11b and CD62L in diabetic microangiopathy. *Acta Diabetol*, 45(3), 183-190. doi: 10.1007/s00592-008-0040-0
- Mastej, K., & Adamiec, R. (2009). [Neutrophil surface expression of adhesion molecule CD11b in patients with type 2 diabetes] *Przegl Lek*, 66(5), 228-232 -Abstract-.
- Matthaei, S. (2011). Behandlung des Diabetes mellitus Typ2. *Diabetologie*, 6, 131-136.
- McMillan, D. E. (1989). Increased levels of acute-phase serum proteins in diabetes. *Metabolism*, 38(11), 1042-1046.

- Mealey, B. L. (1998). Impact of advances in diabetes care on dental treatment of the diabetic patient. *Compend Contin Educ Dent*, 19(1), 41-44, 46-48, 50 passim; quiz 60.
- Mealey, B. L., & Rethman, M. P. (2003). Periodontal disease and diabetes mellitus. Bidirectional relationship. *Dent Today*, 22(4), 107-113.
- Meyle, J. (1986). [A new rinsing method for the collection of granulocytes in marginal periodontitis]. *Dtsch Zahnarztl Z*, 41(5), 511-514.
- Meyle, J. (1993). Neutrophil chemotaxis and serum concentration of tumor-necrosis-factor-alpha (TNFA). *J Periodontal Res*, 28(6 Pt 2), 491-493.
- Meyle, J. (1994). Leukocyte adhesion deficiency and prepubertal periodontitis. *Periodontol 2000*, 6, 26-36.
- Meyle, J., & Axmann-Krcmar, D. (1999). Regression coefficient analysis of neutrophil chemotaxis in periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, 14(2), 127-135.
- Morozumi, T., Kubota, T., Sato, T., Okuda, K., & Yoshie, H. (2004). Smoking cessation increases gingival blood flow and gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*, 31(4), 267-272. doi: 10.1111/j.1600-051X.2004.00476.x
- Naghibi, M., Smith, R. P., Baltch, A. L., Gates, S. A., Wu, D. H., Hammer, M. C., & Michelsen, P. B. (1987). The effect of diabetes mellitus on chemotactic and bactericidal activity of human polymorphonuclear leukocytes. *Diabetes Res Clin Pract*, 4(1), 27-35.
- Nakashima, K., Demeurisse, C., & Cimasoni, G. (1994). The recovery efficiency of various materials for sampling enzymes and polymorphonuclear leukocytes from gingival crevices. *J Clin Periodontol*, 21(7), 479-483.
- Nassar, H., Kantarci, A., & van Dyke, T. E. (2007). Diabetic periodontitis: a model for activated innate immunity and impaired resolution of inflammation. *Periodontol 2000*, 43, 233-244. doi: 10.1111/j.1600-0757.2006.00168.x
- Navarro-Sanchez, A. B., Faria-Almeida, R., & Bascones-Martinez, A. (2007). Effect of non-surgical periodontal therapy on clinical and immunological response and glycaemic control in type 2 diabetic patients with moderate periodontitis. *J Clin Periodontol*, 34(10), 835-843. doi: 10.1111/j.1600-051X.2007.01127.x
- Nelson, R. D., Quie, P. G., & Simmons, R. L. (1975). Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Immunol*, 115(6), 1650-1656.

- Noack, B., Genco, R. J., Trevisan, M., Grossi, S., Zambon, J. J., & De Nardin, E. (2001). Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *J Periodontol*, 72(9), 1221-1227. doi: 10.1902/jop.2000.72.9.1221
- O'Leary, T. J., Drake, R. B., & Naylor, J. E. (1972). The plaque control record. *J Periodontol*, 43(1), 38.
- Ozsoy, N., Bostanci, H., & Ayvali, C. (2004). The investigation of the ultrastructural neutrophil changes in alloxan-induced diabetes in rats: response to a chemotactic challenge. *Cell Biochem Funct*, 22(2), 81-87. doi: 10.1002/cbf.1059
- Page, R. C. (1986). Gingivitis. *J Clin Periodontol*, 13(5), 345-359.
- Page, R. C., & Schroeder, H. E. (1976). Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*, 34(3), 235-249.
- Palmer, G. D., Watts, T. L., & Addison, I. E. (1993). A skin window study of neutrophil migration in subjects with localized juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol*, 20(6), 452-456.
- Pickup, J. C., Mattock, M. B., Chusney, G. D., & Burt, D. (1997). NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia*, 40(11), 1286-1292. doi: 10.1007/s001250050822
- Pietruska, M., Zak, J., Pietruski, J., & Wysocka, J. (2005). Expressions of selected adhesion molecules on peripheral blood leukocytes in patients with aggressive periodontitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 53(3), 266-271.
- Quigley, G. A., & Hein, J. W. (1962). Comparative cleansing efficiency of manual and power brushing. *J Am Dent Assoc*, 65, 26-29.
- Rathmann, W., Tamayo T., Schulze, M., Scheidt-Nave, C., Rothe, U. (2011). Stellungnahme der AG Epidemiologie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft zum IDF Diabetes Atlas: Wie häufig ist Typ 2-Diabetes in Deutschland?
- Rebuck, J. W., & Crowley, J. H. (1955). A method of studying leukocytic functions in vivo. *Ann N Y Acad Sci*, 59(5), 757-805.
- Ringelberg, M. L., Dixon, D. O., Francis, A. O., & Plummer, R. W. (1977). Comparison of gingival health and gingival crevicular fluid flow in children with and without diabetes. *J Dent Res*, 56(2), 108-111.
- Rosenberg, C. S. (1990). Wound healing in the patient with diabetes mellitus. *Nurs Clin North Am*, 25(1), 247-261.

- Ross, G. D., & Lambris, J. D. (1982). Identification of a C3bi-specific membrane complement receptor that is expressed on lymphocytes, monocytes, neutrophils, and erythrocytes. *J Exp Med*, 155(1), 96-110.
- Ross, G. D., & Vetvicka, V. (1993). CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. *Clin Exp Immunol*, 92(2), 181-184.
- Saglie, R., Newman, M. G., Carranza, F. A., Jr., & Pattison, G. L. (1982). Bacterial invasion of gingiva in advanced periodontitis in humans. *J Periodontol*, 53(4), 217-222.
- Saito, T., Murakami, M., Shimazaki, Y., Oobayashi, K., Matsumoto, S., & Koga, T. (2003). Association between alveolar bone loss and elevated serum C-reactive protein in Japanese men. *J Periodontol*, 74(12), 1741-1746. doi: 10.1902/jop.2003.74.12.1741
- Sakallioğlu, E. E., Ayas, B., Sakallioğlu, U., Yavuz, U., Acikgoz, G., & Firatli, E. (2007). Osmotic pressure and vasculature of gingiva in experimental diabetes mellitus. *J Periodontol*, 78(4), 757-763. doi: 10.1902/jop.2007.060332
- Sakallioğlu, E. E., Lutfioğlu, M., Sakallioğlu, U., Diraman, E., & Keskiner, I. (2008). Fluid dynamics of gingiva in diabetic and systemically healthy periodontitis patients. *Arch Oral Biol*, 53(7), 646-651. doi: 10.1016/j.archoralbio.2007.12.013
- Salvi, G. E., Kandyaki, M., Troendle, A., Persson, G. R., & Lang, N. P. (2005). Experimental gingivitis in type 1 diabetics: a controlled clinical and microbiological study. *J Clin Periodontol*, 32(3), 310-316. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00682.x
- Salvi, G. E., Lawrence, H. P., Offenbacher, S., & Beck, J. D. (1997). Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000*, 14, 173-201.
- Salvi, G. E., Yalda, B., Collins, J. G., Jones, B. H., Smith, F. W., Arnold, R. R., & Offenbacher, S. (1997). Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Periodontol*, 68(2), 127-135.
- Saxer, U. P., & Muhlemann, H. R. (1975). [Motivation and education]. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd*, 85(9), 905-919.
- Shapiro, H. M. (2003). Practical flow cytometry, 4th Edition. *Wiley-Liss*.
- Schwartz, J., Stinson, F. L., & Parker, R. B. (1972). The passage of tritiated bacterial endotoxin across intact gingival crevicular epithelium. *J Periodontol*, 43(5), 270-276.

- Segal, A. W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol*, 23, 197-223. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653
- Shetty, N., Thomas, B., & Ramesh, A. (2008). Comparison of neutrophil functions in diabetic and healthy subjects with chronic generalized periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*, 12(2), 41-44. doi: 10.4103/0972-124x.44089
- Shillitoe, E. J., & Lehner, T. (1972). Immunoglobulins and complement in crevicular fluid, serum and saliva in man. *Arch Oral Biol*, 17(2), 241-247.
- Sigusch, B., Eick, S., Pfister, W., Klinger, G., & Glockmann, E. (2001). Altered chemotactic behavior of crevicular PMNs in different forms of periodontitis. *J Clin Periodontol*, 28(2), 162-167.
- Sima, C., Rhourida, K., Van Dyke, T. E., & Gyrko, R. (2010). Type 1 diabetes predisposes to enhanced gingival leukocyte margination and macromolecule extravasation in vivo. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *J Periodontal Res*, 45(6), 748-756. doi: 10.1111/j.1600-0765.2010.01295.x
- Simon, S. I., Chambers, J. D., Butcher, E., & Sklar, L. A. (1992). Neutrophil aggregation is beta 2-integrin- and L-selectin-dependent in blood and isolated cells. *J Immunol*, 149(8), 2765-2771.
- Skapski, H., & Lehner, T. (1976). A crevicular washing method for investigating immune components of crevicular fluid in man. *J Periodontal Res*, 11(1), 19-24.
- Smith, C. W., Marlin, S. D., Rothlein, R., Toman, C., & Anderson, D. C. (1989). Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest*, 83(6), 2008-2017. doi: 10.1172/jci114111
- Sperandio, M. (2006). Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *FEBS J*, 273(19), 4377-4389. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05437.x
- Spranger, J., Kroke, A., Mohlig, M., Hoffmann, K., Bergmann, M. M., Ristow, M., Pfeiffer, A. F. (2003). Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes*, 52(3), 812-817.
- Springer, T. A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 346(6283), 425-434. doi: 10.1038/346425a0

- Srinivas, M., Chethana, K. C., Padma, R., Suragimath, G., Anil, M., Pai, B. S., & Walvekar, A. (2012). A study to assess and compare the peripheral blood neutrophil chemotaxis in smokers and non smokers with healthy periodontium, gingivitis, and chronic periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*, 16(1), 54-58. doi: 10.4103/0972-124x.94605
- Sun, W. L., Chen, L. L., Zhang, S. Z., Wu, Y. M., Ren, Y. Z., & Qin, G. M. (2011). Inflammatory cytokines, adiponectin, insulin resistance and metabolic control after periodontal intervention in patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *Intern Med*, 50(15), 1569-1574.
- Suvan, J., D'Aiuto, F., Moles, D. R., Petrie, A., & Donos, N. (2011). Association between overweight/obesity and periodontitis in adults. A systematic review. *Obes Rev*, 12(5), e381-404. doi: 10.1111/j.1467-789X.2010.00808.x
- Taylor, B. A., Tofler, G. H., Carey, H. M., Morel-Kopp, M. C., Philcox, S., Carter, T. R., Schenck, K. (2006). Full-mouth tooth extraction lowers systemic inflammatory and thrombotic markers of cardiovascular risk. *J Dent Res*, 85(1), 74-78.
- Taylor, G. W., Burt, B. A., Becker, M. P., Genco, R. J., Shlossman, M., Knowler, W. C., & Pettitt, D. J. (1998). Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. *J Periodontol*, 69(1), 76-83.
- Teles, R., Sakellari, D., Teles, F., Konstantinidis, A., Kent, R., Socransky, S., & Haffajee, A. (2010). Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *J Periodontol*, 81(1), 89-98. doi: 10.1902/jop.2009.090397
- Theilade, J., & Attström, R. (1985). Distribution and ultrastructure of subgingival plaque in beagle dogs with gingival inflammation. *J Periodontal Res*, 20(2), 131-145.
- Thomas, L. (2008). Labor und Diagnose : Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. *Frankfurt: TH-Books-Verl.-Ges.*
- Thorstensson, H., Falk, H., Hugoson, A., & Kuylensstierna, J. (1989). Dental care habits and knowledge of oral health in insulin-dependent diabetics. *Scand J Dent Res*, 97(3), 207-215.
- Tsai, C., Hayes, C., & Taylor, G. W. (2002). Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community Dent Oral Epidemiol*, 30(3), 182-192.

- Tufano, M. A., Ianniello, R., Sanges, M. R., & Rossano, F. (1992). Neutrophil function in rapidly progressive and adult periodontitis. *Eur J Epidemiol*, 8(1), 67-73.
- Valerius, N. H., Eff, C., Hansen, N. E., Karle, H., Nerup, J., Soeberg, B., & Sorensen, S. F. (1982). Neutrophil and lymphocyte function in patients with diabetes mellitus. *Acta Med Scand*, 211(6), 463-467.
- van de Vijver, E., Maddalena, A., Sanal, O., Holland, S. M., Uzel, G., Madkaikar, M., Roos, D. (2012). Hematologically important mutations: leukocyte adhesion deficiency (first update). *Blood Cells Mol Dis*, 48(1), 53-61. doi: 10.1016/j.bcmd.2011.10.004
- Van Dyke, T. E., & Hoop, G. A. (1990). Neutrophil function and oral disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1(2), 117-133.
- Van Epps, D. E., Bankhurst, A. D., & Williams, R. C., Jr. (1977). Casein-mediated neutrophil chemotaxis: a parallel between surface binding and chemotaxis. *Inflammation*, 2(2), 115-123.
- Van Ginderachter, J. A., Movahedi, K., Hassanzadeh Ghassabeh, G., Meerschaut, S., Beschin, A., Raes, G., & De Baetselier, P. (2006). Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology*, 211(6-8), 487-501. doi: 10.1016/j.imbio.2006.06.002
- van Oostrom, A. J., van Wijk, J. P., Sijmonsma, T. P., Rabelink, T. J., & Castro Cabezas, M. (2004). Increased expression of activation markers on monocytes and neutrophils in type 2 diabetes. *Neth J Med*, 62(9), 320-325.
- Visser, M., Bouter, L. M., McQuillan, G. M., Wener, M. H., & Harris, T. B. (1999). Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA*, 282(22), 2131-2135.
- Walrand, S., Guillet, C., Boirie, Y., & Vasson, M. P. (2004). In vivo evidences that insulin regulates human polymorphonuclear neutrophil functions. *J Leukoc Biol*, 76(6), 1104-1110. doi: 10.1189/jlb.0104050
- Watanabe, K., Blew, B., Scherer, M., Burke, J., Koh, G., Block, C., Frommel, T. O. (1997). CD11b mRNA expression in neutrophils isolated from peripheral blood and gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*, 24(11), 814-822.
- Watanabe, K., Hagen, K. L., & Andersen, B. R. (1991). CD11b expression on neutrophils in human crevicular fluid collected from clinically healthy gingivae. *J Periodontal Res*, 26(2), 91-96.

- Weissmann, G., Zurier, R. B., & Hoffstein, S. (1972). Leukocytic proteases and the immunologic release of lysosomal enzymes. *Am J Pathol*, 68(3), 539-564.
- Westfelt, E., Rylander, H., Blohme, G., Jonasson, P., & Lindhe, J. (1996). The effect of periodontal therapy in diabetics. Results after 5 years. *J Clin Periodontol*, 23(2), 92-100.
- WHO. (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 894, i-xii, 1-253.
- Wierusz-Wysocka, B., Wysocki, H., Siekierka, H., Wykretowicz, A., Szczepanik, A., & Klimas, R. (1987). Evidence of polymorphonuclear neutrophils (PMN) activation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Leukoc Biol*, 42(5), 519-523.
- Wright, S. D., Weitz, J. I., Huang, A. J., Levin, S. M., Silverstein, S. C., & Loike, J. D. (1988). Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(20), 7734-7738.
- Yamagishi, S. (2011). Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes. *Exp Gerontol*, 46(4), 217-224. doi: 10.1016/j.exger.2010.11.007
- Zhang, W. Y., Schwartz, E., Wang, Y., Attrep, J., Li, Z., & Reaven, P. (2006). Elevated concentrations of nonesterified fatty acids increase monocyte expression of CD11b and adhesion to endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(3), 514-519. doi: 10.1161/01.atv.0000200226.53994.09
- Zigmond, S. H. (1977). Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *J Cell Biol*, 75(2 Pt 1), 606-616.
- Zigmond, S. H. (1989). Chemotactic response of neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1(6), 451-453.
- Zigmond, S. H., & Hirsch, J. G. (1973). Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation, and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. *J Exp Med*, 137(2), 387-410.

13. Anhang

A.	Periotronkalibrierung	129
B.	Parameter CD45	130
C.	Parameter CD11b	130
D.	Parameter CD15	130
E.	Anamnese, eingehende zahnärztliche Untersuchung und parodontale Befunderhebung.....	131
F.	Verwendete Geräte und Materialien.....	138

A. Periotronkalibrierung

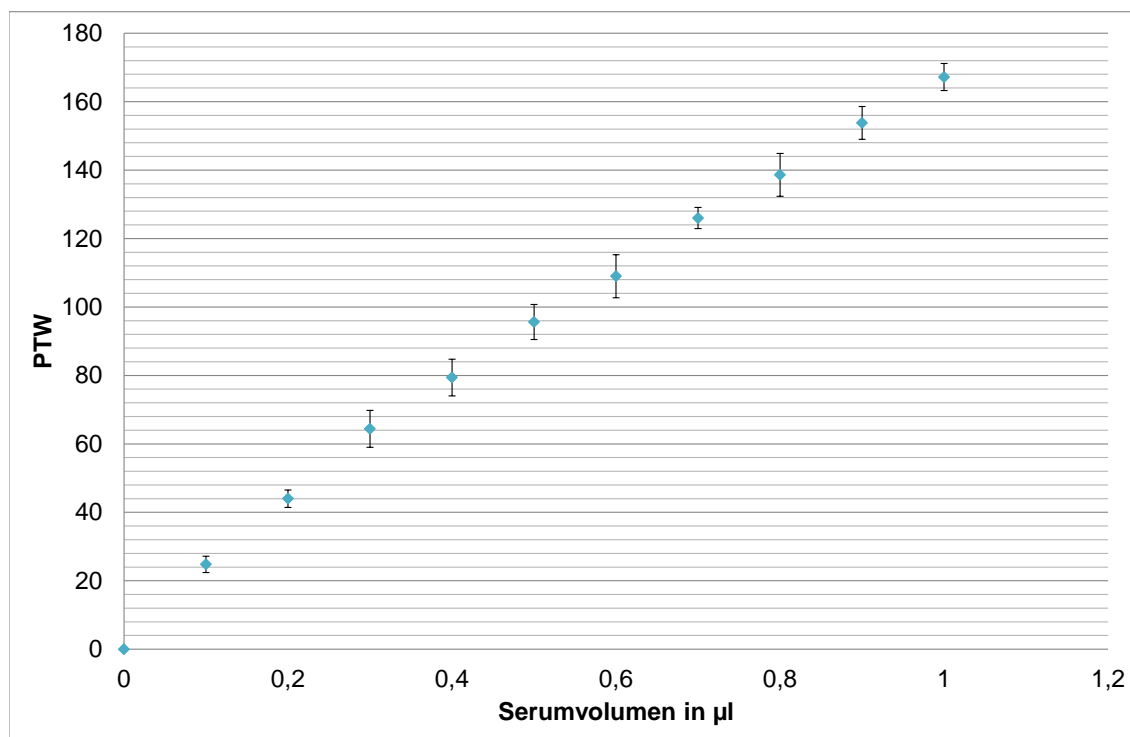


Abbildung 52: Messergebnisse der Periotronkalibrierung. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung.

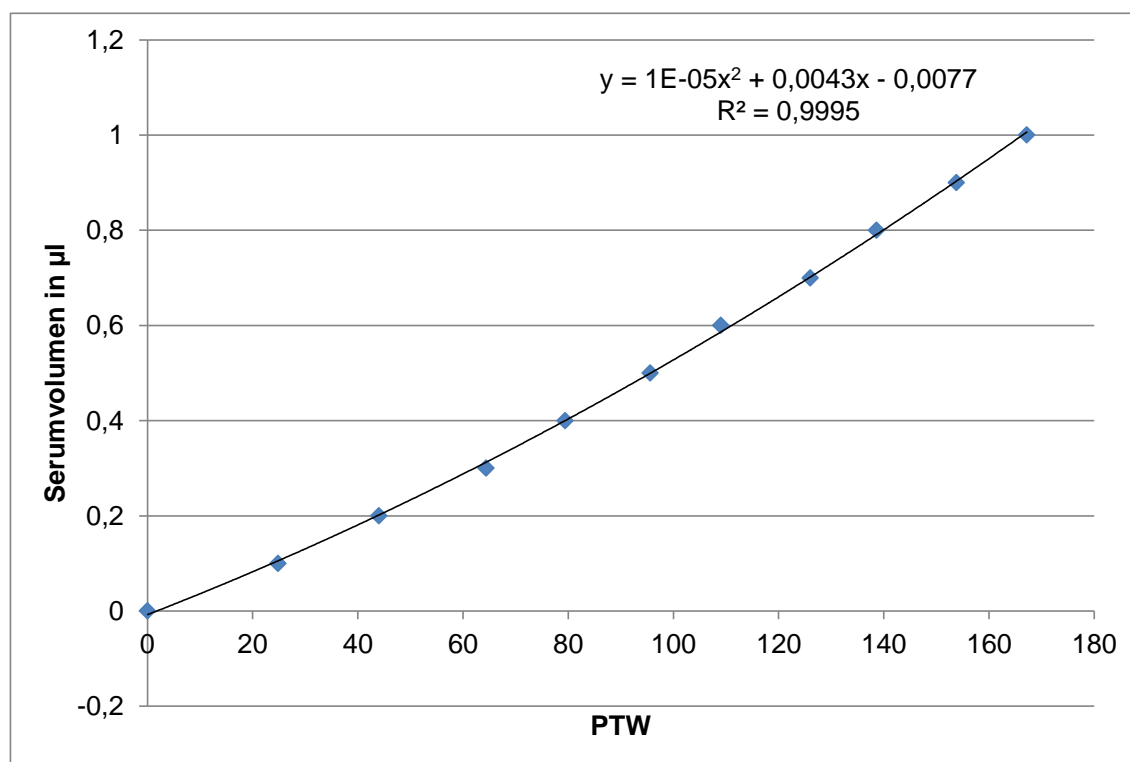


Abbildung 53: Regressionskurve durch Mittelwerte der Periotronkalibrierung.

B. Parameter CD45

Tabelle 33: Anschlusstest für Kruskal-Wallis-H-Test bezüglich der Summe CD45+ Zellen von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen.

<u>n_ges</u>	<u>grp1</u>	<u>grp2</u>	<u>s_umf1</u>	<u>s_umf2</u>	<u>mean_s1</u>	<u>mean_s2</u>	<u>diff_msa</u>	<u>krit_diff</u>	<u>unter</u>
29	Parodontitis und Diabetes	gesund	10	10	20.4	15.1000	5.3000	9.32074	0
29	Parodontitis und Diabetes	Parodontitis	10	9	20.4	8.8889	11.5111	9.57615	1
29	gesund	Parodontitis	10	9	15.1	8.8889	6.2111	9.57615	0

C. Parameter CD11b

Tabelle 34: Anschlusstest für Kruskal-Wallis-H-Test bezüglich der Fluoreszenz anti CD11b-APC von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen.

<u>n_ges</u>	<u>grp1</u>	<u>grp2</u>	<u>s_umf1</u>	<u>s_umf2</u>	<u>mean_s1</u>	<u>mean_s2</u>	<u>diff_msa</u>	<u>krit_diff</u>	<u>unter</u>
29	Parodontitis und Diabetes	gesund	10	10	20.4	15.1000	5.3000	9.32074	0
29	Parodontitis und Diabetes	Parodontitis	10	9	20.4	8.8889	11.5111	9.57615	1
29	gesund	Parodontitis	10	9	15.1	8.8889	6.2111	9.57615	0


D. Parameter CD15

Tabelle 35: Anschlusstest für Kruskal-Wallis-H-Test bezüglich der Fluoreszenz anti CD15-APC von stimulierten und nicht stimulierten Ansätzen.

<u>n_ges</u>	<u>grp1</u>	<u>grp2</u>	<u>s_umf1</u>	<u>s_umf2</u>	<u>mean_s1</u>	<u>mean_s2</u>	<u>diff_msa</u>	<u>krit_diff</u>	<u>unter</u>
28	Parodontitis und Diabetes	gesund	10	9	20.7000	14.5556	6.1444	9.25144	0
28	Parodontitis und Diabetes	Parodontitis	10	9	20.7000	7.5556	13.1444	9.25144	1
28	gesund	Parodontitis	9	9	14.5556	7.5556	7.0000	9.49178	0

E. Anamnese, eingehende zahnärztliche Untersuchung und parodontale Befunderhebung

Periodontal Chart



Medical Alerts

Chart #: [REDACTED]

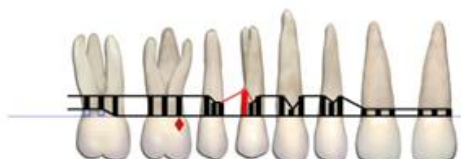
Name: [REDACTED]

Examiner: [REDACTED]

Date: [REDACTED]

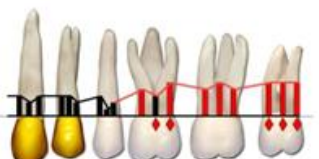
	Right										Left									
Recession	1 1 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0				
Depth	2 2 3	3 3 3	3 2 2	4 2 3	3 1 3	3 2 3	1 1 1	1 1 1			3 2 3	3 3 2	3 1 2	4 3 5	4 5 4	5 5 5				

GM



Facial


GM



Facial

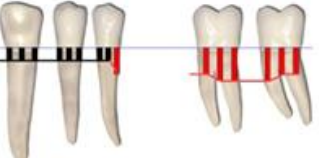
	Right										Left									
Depth	5 4 4	4 2 4	4 2 4	4 2 3	3 2 3	3 2 2	2 2 2	2 2 2	2 2 2	2 2 2	2 2 2	2 1 2	3 2 3	3 2 4	4 5 5	5 5 5				
Recession	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0				
Mobility	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
Recession	3 3 4	6 7 9	4 2 3	2 2 3	2 2 2	2 2 2	2 2 2	2 2 2	2 3 2	2 2 2	2 2 2	2 2 2	2 2 4	4 5 5	5 4 4					

GM



Lingual

GM



Lingual

	Right										Left									
Depth	3 3 4	4 0 2	3 3 3	2 2 2	3 3 2	2 2 2	2 1 2	3 2 3	3 2 3	3 2 2	2 2 2	2 2 2	2 2 2	2 2 2	3 3 4	3 3 4				
Recession	0 0	3 4 2	1																	

Summary

Seher: Gümüş has 28 teeth, 41 of 168 sites or 24% of the pocket depths are greater than 3.4 mm

Bleeding: 41 sites (24%) bleeding

Suppuration: 2 sites (1%) suppuration

Recession: 4 teeth had some recession with 1 having recession equal to or greater than 3.0 mm

Furcation: 0 furcations were found

Mobility: 0 teeth had some degree of mobility

Summary

Depth:	41 sites	24%	>= 3.4mm
Bleeding:	41 sites	24%	
Suppuration:	2 sites	1%	
Recession:	4 teeth		
Furcation:	0		
Mobility:	0 teeth		

Copyright © 1996-2008 by Florida Probe Corporation, All Rights Reserved - Gainesville, Florida, USA

Abbildung 54: Beispielhafter Florida-Probe Befund für Patienten mit Parodontitis und Diabetes mellitus Typ 2.

PARODONTALSTATUS

Name :	Vorname :	Geb.dat.:
Untersuchungsart :	<input type="checkbox"/> Erst <input type="checkbox"/> Reev. <input type="checkbox"/> Abschluß <input type="checkbox"/> Recall	Datum :
Diagnose :	<input type="checkbox"/> G <input type="checkbox"/> NUG <input type="checkbox"/> NUP <input type="checkbox"/> AP <input type="checkbox"/> CP <input type="checkbox"/> P-SYS	
Behandler :	<input type="checkbox"/> Stud. <input type="checkbox"/> Assi. <input type="checkbox"/> Wi	Behandlung : <input type="checkbox"/> Kurs I <input type="checkbox"/> Kurs II

	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28	
Diagn.																	Diagn.
Progn.																	Progn.
akut																	akut
Belag																	Belag
Gingiva																	Gingiva
Lock.																	Lock.

Vipr.																	Vipr.	
	15	12	9	6	3	0	15	12	9	6	3	0	15	12	9	6	3	0
v																	v	
OK																	OK	
p																	p	

Vipr.																	Vipr.	
	15	12	9	6	3	0	15	12	9	6	3	0	15	12	9	6	3	0
I																	I	
UK																	UK	
v																	v	

Lock.																	Lock.
Gingiva																	Gingiva
akut																	akut
Belag																	Belag
Progn.																	Progn.
Diagn.																	Diagn.
	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38	

Weitere Befunde : _____

Abbildung 55: Befundbogen für eingehende zahnärztliche Untersuchung.

Poliklinik für Parodontologie (Direktor: Prof. Dr. J. Meyle) Medizinisches Zentrum für Zahn-, Mund und Kieferheilkunde Justus Liebig Universität Schlangenzahl 14 35392 Gießen		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 5px;">ID-No.</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 5px;">DATE</div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; margin: 5px;">Label</div>
CRF			
Studie: Zytosolische Signalübertragung humaner polymorphkerniger Granulozyten und zelluläre Effektorfunktionen bei Patienten mit Diabetes mellitus und chronischer Parodontitis			
Studienleiter und Prüfarzt: Dr. J.M. Herrmann (Tel. 0641/99-46192)			Datum der geplanten Entlassung von Station
Name, Vorname: _____			
Geb. Datum: _____ Alter zum Studienbeginn: _____ Jahre & _____ Monate (18-70a)			
Adresse: _____			
Telefon z.Zt. auf Station: _____ privat: _____			
dienstlich: _____ mobil: _____ e-Mail: _____			
Sehr geehrte(r) StudienteilnehmerIn, <input type="checkbox"/> Patient <input type="checkbox"/> Proband			
Sie haben Ihr Einverständnis gegeben an dieser wissenschaftlichen Untersuchung teilzunehmen wir bitten Sie daher um etwas Zeit folgende Fragen mit Ihnen durchsprechen zu dürfen. Ihre Angaben unterliegen selbstverständlich der ärztlichen Schweigepflicht. Viele Erkrankungen können Auswirkungen bzw. Einfluss auf Behandlung und auch Studienergebnisse haben, wie z.B. Leberentzündung (Hepatitis), HIV/AIDS, Tuberkulose oder Geschlechtskrankheiten (z.B. Syphilis). Einige Erkrankung erfordern entsprechende Schutzmassnahmen, bitte informieren Sie uns auch, wenn im Laufe der Studie Veränderungen Ihres Gesundheitszustandes eintreten.			
Vielen Dank für Ihre Mitarbeit!			
<input type="checkbox"/> PSI > 3		<input type="checkbox"/> PSI < 2	
Zahnzahl: _____		(> 12)	
DM Typ I		Beginn: _____	
DM Typ II		Beginn: _____	
Tritt Diabetes mellitus in Ihrer Familie gehäuft auf?			
bisherige diabetologische Therapie: <input type="checkbox"/> Diät <input type="checkbox"/> Tabletten (o.a.) <input type="checkbox"/> Insulin / s.c. Präparate:			
letzter (auch <i>alio loco</i>) HbA _{1c} = _____ % Datum: _____			
Wie lange besteht Ihr Diabetes mellitus			
O Alter: _____ O ggf. Datum der Erstdiagnose: _____			
Psychische Beeinträchtigung oder Erkrankung?			
Drogen- oder Alkoholabusus?			
derzeitiger <input type="checkbox"/> Zigaretten- (<input type="checkbox"/> < 10 Zig. <input type="checkbox"/> < 20 Zig.)			
oder <input type="checkbox"/> anderer Tabakkonsum:			
ggf. Beginn / Dauer des Konsums: _____ (Jahr) / _____ (Jahre)			
vormaliger Nikotingenuss?			
Dauer: _____ (Jahre) bis vor _____ (Jahren)			
BMI $\frac{\text{kg}}{\text{m}^2} = \frac{\text{kg}}{\text{m}^2}$ _____ ($< 18,5 \text{ kg/m}^2$)			
Schwangerschaft			
Steroidbehandlung innerhalb der letzten 6 Wochen?			
Welche?			

Abbildung 56: Anamnesebogen Seite 1.

	ja	nein
Antibiotikaeinnahme innerhalb der letzten 6 Wochen? Welche?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kalziumantagonistenmedikation? Welche?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Systemische Medikation Welche?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(Medikamenten-) Allergien?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Anfallsleiden?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Atemwegserkrankung?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Blutgerinnungsstörung?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Glaukom?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schilddrüsenerkrankung?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Brustschmerz oder vom Herz ausgehende Beschwerden (Angina pectoris)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Koronare Herzkrankheit?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Herzinfarkt (wann?)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Herzinsuffizienz	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Herzrhythmusstörung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Herzschrittmacher	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Herzklappenfehler, -ersatz (bitte erläutern und seit wann bekannt?)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schlaganfall / TIA (wann)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Arterielle Verschlusskrankheit	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bluthochdruck	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
niedriger Blutdruck	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gelbsucht (Hepatitis, welche?)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
andere Lebererkrankungen (welche?)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
HIV/AIDS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Magen-Darm-Erkrankungen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nierenleiden, -insuffizienz, Dialyse	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Osteoporose	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
rheumatoide Arthritis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Abbildung 57: Anamnesebogen Seite 2.

Tumorerkrankungen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
frühere Operationen (welche, wann?)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
künstliche Gelenke o. sonstige Endoprothesen (seit wann?)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Haben Sie Schmerzen an den <input type="checkbox"/> Zähnen oder dem <input type="checkbox"/> Zahnfleisch – wenn ja seit wann?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Leiden Sie an Zahnfleischbluten – wenn ja seit wann?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Haben Sie Zähne durch Lockerung verloren? (bitte ggf. die Anzahl notieren)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Treten Zahnfleischerkrankungen in Ihrer Familie gehäuft auf?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gehen Sie regelmäßig zum Zahnarzt? Wie oft pro Jahr?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Wie oft reinigen Sie Ihre Zähne am Tag?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> 1x <input type="checkbox"/> 2x <input type="checkbox"/> 3x <input type="checkbox"/> nach jeder Mahlzeit		
Andere schwerwiegende orale Erkrankungen außer einer Parodontitis?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Wurde bei Ihnen bereits eine Zahnfleischbehandlung durchgeführt?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Innerhalb der letzten 6 Monate oder <input type="checkbox"/> innerhalb der letzten 5 Jahre?		

Welche Hilfsmittel verwenden Sie zur Zahnreinigung? Bitte ankreuzen!

	nach jeder Mahlzeit	3x tgl.	2x tgl.	1x tgl.	≥ 3x / Woche	1-2x / Woche	nie
<input type="checkbox"/> Handzahnbürste							
<input type="checkbox"/> elektrische Zahnbürste							
<input type="checkbox"/> Munddusche							
<input type="checkbox"/> Zahncreme							
<input type="checkbox"/> Zahnseide							
<input type="checkbox"/> Interdentälbürste							
<input type="checkbox"/> Zahnhölzchen							
<input type="checkbox"/> Mundwasser/Spüllösung							

☐ Sonstiges: _____

Ich verpflichte mich, Änderungen, die sich im Laufe der Studie ergeben dem behandelnden Arzt / Studienleiter mitzuteilen. Die Richtigkeit meiner Angaben wird bestätigt:

Gießen, den _____

(Datum)

(Unterschrift)

Abbildung 58: Anamnesebogen Seite 3.

Visit_1: PAR₁ / PSI / SY₁

Informed Consent, CRF and clinical parameters

DATE & Signature

☐ Two (IRB) consent forms according proposal "AZ 175107 dated 12/20/2007", accepted from the Ethic Committee at the Justus Liebig University, Gießen, additionally one CRF (information personally explained – participant's questions answered written informed consent).

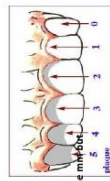
☐ glc_{mean} _____

☐ PSR: _____ ☐ full FP exam - chart-No.: _____ ☐ BMI: _____

☐ **Modified PBI —Modified papilla bleeding index:** PBI will be determined on each inter-proximal papilla except those mesial of the medial incisors by a modified procedure based on the studies of Saver et al. (Saver & Muhlemann 1979). A score of 0 to 4 will be given instantaneously after papilla probing with **0: no bleeding; 1: light, spotted bleeding; 2: moderate bleeding, several spots or a distinct line; 3: bleeding likely to fill the inter-proximal space and 4: almost spontaneous profound bleeding.**

	[body weight in kg] / [height in meters] ² = _____ kg / m ²													
	[Σ of bleeding values] / [No. of total sites] = (mean - mPBI)													
upper														
interproximal space No.	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7
lower														
mean														

time _____ glc [mg/dl] _____



☐ **Modified Quigley Hein PBI — Modified dental plaque index:** plaque will be assessed on 4 surfaces per tooth: lingual, buccal, interproximal & mesial and distal (excluding the 2 proximal surfaces). (Quigley et al. 1966) For the plaque index, the index is based on the extent of plaque on the tooth. 2: a thin, translucent band of plaque less than one-third of the crown of the tooth; 3: plaque covering at least one-third but less than two-thirds of the crown of the tooth; 4: plaque covering two-thirds or more of the crown of the tooth.

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

Specimens

- ☐ Pre-label and fill out 2 hematology forms (use study stickers ID: 50:73)
- ☐ 50 ml venipuncture for functional assays - on blue ice
employ Ectolyse™ (Disposmed Witt OHG, Gelnhausen) 18G butterfly; draw directly into citrate preloaded 50 ml syringe @ Prof. Bretzel's clinical units Rotholz 6 or in Prof. Mayle's department; aliquot content of the syringe into 2 pre-rinsed 50 ml non-sterile falcons tubes (Sarstedt) and fill up with 2% dextran 0.9% NaCl sol. for gravity sedimentation. Harbor all specimens in a cooler on blue ice, but do not freeze! Consecutive assay procedures should be performed in the lab 337.
- ☐ 2x 2.7 ml potassium-EDTA (parameters 2 and 3) - on blue ice
on your way to the dental school or immediately after venipuncture, involve the civil service - currently Mr. Mueller @ 463740 drop off this vacutainer @ Prof. Katz's lab in the pediatric clinic; entering from the biochemical building (north entrance) use the elevator up to floor "0"; preferentially before 1.00 pm - You might have to use the speaker phone (+41553 or +41554) to reach a representative of the Dept. of Klinische Chemie. (Check this and the following via - i.e. LI-HEP, as well as the UKGM venipuncture form with study ID 50:73 and patient or control labels). DO NOT FREEZE specimen vials - thus, use blue ice and plastic bag insulation!
- ☐ 1x 7.5 ml lithium-heparin (1, 5, 7-11) (same procedure - as 2.7 ml potassium EDTA)
- ☐ 3.5 ml 1:5 citrate / ESR - @ RT in lab 337
- ☐ 9 ml serum - insulated with plastic wrap - on blue ice bring instantaneously to lab 337 using the cooler; immediately make serum; use the pre-cooled Megafuge 1.0 R - conditions: centrifuge @ 3500 r.p.m. and +4 °C; aliquot at least 1500µl each on blue ice into 2 cryo-prelabeled "impach" serum tubes (Sarstedt No. 60.549) and store -subito- @ -70 °C (in the basement freezer).
- ☐ 1x 7.5 ml serum (4 and 6) (same procedure - as 2.7 ml potassium EDTA)

Abbildung 59: Befundbogen Mundhygiene Tag -14.

F. Verwendete Geräte und Materialien

ADG-Lyse (Andergrub, Lot: 49)

Anti-human CD11b (eBioscience, Lot: E11648-1630)

Anti-human CD15 (BioLegend, Lot: B127387)

Anti-human CD45 (eBioscience, Lot: E13612-101)

Aqua dest.

Braunüle

Butterfly-Nadel 15G

Caseinlösung (steril filtriert)

CyAn™ ADP (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)

CytoCount™ (DakoCytomation, Glostrup/ Dänemark, Lot: 00046697)

Dextran 2 %

Dreiwegeventil

Einmal-Spritze 50 ml

Ethanol 70 %

Ficoll-Plaque Premium, (GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Schweden, Lot.: 10030512)

Florida Probe® (Florida Probe Corporation, Gainesville, FL/USA)

Hämatozytometer

Hamilton-Spritze 1µl (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz/Schweiz)

Handspiegel

Infusionsschlauch

Isotypenkontrolle APC (eBioscience, Lot: E10294-1630)

Isotypenkontrolle FITC (eBioscience, Lot: E1215153-1456)

Luor-Lock-Spritzen 5 ml

Mira-2-Tone® (Hager Werke GmbH & Co. KG, Duisburg, Deutschland)

Mundhygiene-Demo-Modell mit Zahnbürste, Zahnseide und Interdentalbürstchen

NaCl-Lösung 0,9 %

NaCl-Lösung 1,8 %

Natriumzitratlösung 4,3 %

Pale-Tim Schaumstoffpellets (Voco, Cuxhafen, Deutschland)

Periopaper (Ora Flow Inc., NY, USA, Lot. 6183)

Periopaper® (Vetter Laborbedarf, Ammerbuch, Deutschland, Lot. 6183)

Periotron 8000® (Vetter Laborbedarf, Ammerbuch, Deutschland)

Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, und 1000 µl (Eppendorf, Köln/Deutschland)

Polypropylen-Röhrchen 15 ml und 50 ml

S-Sedivette® (Sarstedt AG&Co, Deutschland)

Stoppuhr

Vortex (Vetter Laborbedarf, Ammerbruch/Deutschland)

zahnärztliche Watterollen

zahnärztliches Grundbesteck

14. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware beziehungsweise ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

15. Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Jörg Meyle für die Überlassung des Dissertationsthemas und die gute Betreuung.

Ich danke der Landeszahnärztekammer Hessen für die Förderung dieser Arbeit.

Vielen Dank an Dr. Jens Martin Herrmann, Dr. Sabine Gröger und an meine lieben Kollegen für die motivierende und gute Zusammenarbeit sowohl im Labor, als auch im klinischen Bereich.

Bei meiner Familie möchte ich mich für ihre Unterstützung während des gesamten Studiums und besonders während dieser Arbeit bedanken.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6089-3



9 783835 196089 3